



**T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN BOR KATKILI
BİYOSERAMİK/PVDF-PCL KOMPOZİT İSKELELERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE *IN VITRO* ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Büşra MUTLU

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Doktora Programı

OCAK 2025

**T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN BOR KATKILI
BİYOSERAMİK/PVDF-PCL KOMPOZİT İSKELELERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE *IN VITRO* ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Büşra MUTLU

19297058008

ORCID: 0000-0002-9946-6729

**İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Doktora Programı**

Danışman: Doç. Dr. Şeyma DUMAN

ORCID: 0000-0002-6685-5656

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fatma DEMİRCİ

ORCID: 0000-0002-0617-8606

OCAK 2025

BTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 19297058008 numaralı Doktora Öğrencisi Büşra MUTLU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN BOR KATKILI BİYOSERAMİK/PVDF-PCL KOMPOZİT İSKELELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE *IN VITRO* ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Şeyma DUMAN**
Bursa Teknik Üniversitesi

İkinci Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Fatma DEMİRCİ**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Ebru Devrim ŞAM PARMAK**
Bursa Teknik Üniversitesi

.....
Prof. Dr. Hüseyin LEKESİZ
Bursa Teknik Üniversitesi

.....
Dr. Öğr. Üyesi Faiz MUHAFFEL
İstanbul Teknik Üniversitesi

.....
Dr. Öğr. Üyesi Cansu CANBEK
Yeditepe Üniversitesi

Teslim Tarihi :

Savunma Tarihi :



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 124M221 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Büşra MUTLU

İmzası:





Babaanneme,

ÖNSÖZ

Doktora eğitim sürecimde bursiyer olarak görev aldığım 100/2000 Doktora Bursu Programı kapsamında maddi destek sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu (YÖK)'e, 2211-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Doktora Burs Programı ve 124M221 numaralı proje kapsamında finansal destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

Hayatımın büyük bir bölümünü oluşturan bilimsel yolculuğumun ilk gününden bu yana danışmanlığımı üstlenen, doktora tezimin yürütülmesi ve sonuçlandırılması için sabrını, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgisini ve tüm olanaklarını büyük bir samimiyetle paylaşan, beni her zaman cesaretlendiren ve bana kattıklarıyla hayatıma dokunan çok değerli danışmanım Doç. Dr. Şeyma DUMAN'a sonsuz saygı, minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresince bilgisiyle çalışmamı taçlandıran, beni yönlendiren ve düşünürken kendi sınırlarımı aşmamı sağlayan değerli eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fatma DEMİRCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca her zaman ılımlı ve anlayışlı yaklaşımlarıyla değerli yorum ve önerilerini benimle paylaşan tez izleme komitesi üyesi hocalarım Prof. Dr. Ebru Devrim ŞAM PARMAK ve Prof. Dr. Hüseyin LEKESİZ'e, tez çalışmamda yer alan hücre kültürü çalışmalarımın tamamlanmasında beni içtenlikle destekleyen Prof. Dr. Berrin TUNCA, Dr. Melis ERÇELİK ve Çağla TEKİN'e, çalışmalarım süresince her türlü laboratuvar imkanını sağlayan Bursa Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı (MERLAB) yöneticilerine,

Bilimsel yolculuğumun en kıymetli hediyelerinden olan, motivasyon konuşmalarını hiç eksik etmeyen güzel yürekli arkadaşım Hazal YILMAZ DOĞAN'a, kendimi bildim bileli hayatımda olan, yıllar geçse de yeri asla değişmeyen, her zaman ne olursa olsun yanımda olan, dostluğunun bir ömür benimle olmasını dilediğim biricik çocukluk arkadaşım Mina ÜZÜLMEZ YILDIZ'a,

Kalplerinin güzellikleri ile her zaman yanımda olan büyük destekçilerim kayınvalidem Gülşen MUTLU, kayınpederim Günay MUTLU ve tüm ailesine, hayatım boyunca attığım her adımda olduğu gibi doktora sürecimde de bana destek olan, hayallerimin peşinden benimle koşan, bana asla pes etmemeyi öğreten, güvenlerini ve sevgilerini her zaman hissettiğim canım annem Güler BULUT, babam Aydın BULUT ve kardeşim Tuğba BULUT'a, üzerimdeki emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim, desteğini her zaman kalbimde hissettiğim canım babaannem Nevri BULUT'a, hayatta mucizelere inanmamı sağlayan, kendime ve dünyaya bakış açımı değiştiren, tüm mutlu ve umutsuz anlarımda benimle olan, bu zorlu süreçte tüm stresimi, nazımı çeken yol arkadaşım Mert MUTLU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2025

Büşra MUTLU
(Metalurji ve Malzeme
Yüksek Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
ÖZET.....	xvix
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 Genel Bilgiler	4
1.1.1 Kemik dokunun yapısı ve özellikleri	5
1.1.1.1 Kemik hücreleri ve yeni kemik oluşumu	7
1.1.2 Kemik doku mühendisliği yaklaşımı.....	10
1.1.3 Doku iskeleleri	11
1.1.3.1 Doku iskelelerinde kullanılan biyomalzemeler.....	12
1.1.3.2 Membran doku iskeleleri	22
1.1.3.3 Membran doku iskelelerinin üretim yöntemleri.....	23
2. BOR KATKILI BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT (BCP)/POLİVİNİLİDEN FLORÜR (PVDF) ESASLI MEMBRAN İSKELELERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU	28
2.1 Giriş.....	28
2.2 Deneysel Çalışmalar.....	30
2.2.1 Malzemeler.....	30
2.2.2 Bor katkılı BCP tozlarının sentezi	31
2.2.3 Bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran iskelelerin üretimi	31
2.2.4 Karakterizasyon	32
2.2.4.1 Bor katkılı BCP tozlarının karakterizasyonu	33
2.2.4.2 Bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran iskelelerinin karakterizasyonu	32
2.3 Bulgular ve Tartışma	37
2.3.1. Bor katkılı BCP tozlarının karakterizasyonu	37
2.3.2. Bor katkılı BCP/PVDF membran doku iskelelerinin karakterizasyonu	39
2.3.2.1 Morfolojik ve fizikokimyasal özellikler.....	39
2.3.2.2 Fiziksel ve mekanik özellikler.....	42
2.3.2.3 Termal özellikler ve β faz içeriği	45
2.3.2.4 <i>In vitro</i> biyolojik özellikler	48
2.4 Sonuçlar.....	54
2. KOAGÜLASYON BANYO SICAKLIĞININ BCP/PVDF ESASLI MEMBRAN İSKELELERİN ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	55
3.1 Giriş.....	55
3.2 Deneysel Çalışmalar.....	57
3.2.1 Malzemeler.....	57
3.2.2 Ağ. %1 bor katkılı BCP/PVDF membran doku iskelelerinin farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretimi.....	57

3.2.3 Karakterizasyon	58
3.2.3.1 Ağ. %1 bor katkılı BCP/PVDF membran doku iskelelerinin karakterizasyonu	58
3.3 Bulgular ve Tartışma	61
3.3.1. Ağ. %1 bor katkılı BCP/PVDF membran doku iskelelerinin karakterizasyonu	61
3.3.1.1 Morfolojik ve yüzey özellikleri	61
3.3.1.2 Fizikokimyasal, termal ve mekanik özellikler	66
3.3.1.3 <i>In vitro</i> biyolojik özellikler	72
3.4 Sonuçlar	79
4. BOR KATKILI BAĞDADİT (BAG)/POLİVİNİLİDEN FLORÜR (PVDF)-POLİKAPROLAKTON (PCL) ESASLI MEMBRAN İSKELELERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU	80
4.1 Giriş	80
4.2 Deneysel Çalışmalar	82
4.2.1 Malzemeler	82
4.2.2 Bor katkılı BAG tozlarının sentezi	83
4.2.3 Bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran iskelelerin üretimi	84
4.2.4 Karakterizasyon	85
4.2.4.1 Bor katkılı BAG tozlarının karakterizasyonu	85
4.2.4.2 Bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran iskelelerinin karakterizasyonu	85
4.3 Bulgular ve Tartışma	90
4.3.1. Bor katkılı BAG tozlarının karakterizasyonu	90
4.3.2. Bor katkılı BAG/PVDF membran doku iskelelerinin karakterizasyonu ..	92
4.3.2.1 Morfolojik ve yüzey özellikleri	92
4.3.2.2 Termal özellikler, β faz içeriği ve mekanik özellikler	95
4.3.2.3 <i>In vitro</i> biyolojik özellikler	100
4.3.2.4 <i>In vitro</i> hücrel aktivite	105
4.3.3. Ağ. %1 bor katkılı bor katkılı BAG/PVDF-PCL membran doku iskelelerinin karakterizasyonu	111
4.3.2.1 Morfolojik özellikler	111
4.3.2.2 <i>In vitro</i> biyolojik özellikler	111
4.4 Sonuçlar	116
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	118
KAYNAKLAR	121
ÖZGEÇMİŞ	144

KISALTMALAR

ALP	: Alkalen fosfataz
ASTM	: Uluslararası Amerikan Test ve Malzeme Topluluğu
ATR-FTIR	: Zayıflatılmış toplam yansıma Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
BAG	: Bağdadit
BCP	: Bifazik kalsiyum fosfat
Ca/P	: Kalsiyum/fosfor oranı
CaP	: Kalsiyum fosfat
COL-I	: Kolajen tip-I
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle medium
DPBS	: Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetre
ECM	: Hücre dışı matris
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
FE-SEM	: Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopisi
g	: Gram
GMC	: Keçi iliği stromal hücreleri
GPa	: Gigapascal
HA	: Hidroksiapatit
HOb	: İnsan osteoblast hücreleri
hMSC	: İnsan mezenkimal kök hücreleri
kN	: Kilonewton
kV	: Kilovolt
L	: Litre
mg	: Miligram
MPa	: Megapaskal
mm	: Milimetre
mm²	: Milimetre kare
mm³	: Milimetre küp

mM	: Milimol
mL	: Mililitre
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NIPS	: Çözücü olmayan indüklenmiş faz ayrımı
PCL	: Polikaprolakton
PCn	: Piezoelektrik katsayı
PEEK	: Polietereterketon
PHBV	: Poli(hidroksibutirat)ko(hidroksivalerat)
PVDF	: Poli(vinilidenflorür)
SBF	: Yapay vücut sıvısı
Tg	: Camı geçiş sıcaklığı
Tm	: Erime sıcaklığı
XRD	: X-ışını kırınımı
WST-I	: 2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum
µL	: Mikrolitre
β-TCP	: Beta-trikalsiyum fosfat

SEMBOLLER

$\%$	: Yüzde
$^{\circ}$	: Santigrat derece
ρ	: Yoğunluk
Au-Pd	: Altın-Paladyum
B	: Bor
F_{β}	: β faz fraksiyonu
Mg	: Magnezyum
Si	: Silisyum
T	: Sıcaklık
Zr	: Zirkonyum
Zn	: Çinko
ΔH_f	: Füzyon ısısı
X_c	: Toplam kristallik

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 : Kemğin kompozisyonu.	6
Çizelge 1.2 : Kemğin biyomekanik özellikleri.	12
Çizelge 1.3 : Bazı kalsiyum fosfat esaslı biyosermiklerin temel özellikleri.	16
Çizelge 2.1 : Üretilen farklı oranlarda bor katkılı BCP/PVDF esaslı kompozit membran doku iskelelerinin döküm çözeltisi bileşimleri.	32
Çizelge 2.2 : 10xSBF stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan reaktiflerin konsantrasyonları.	35
Çizelge 2.3 : Farklı oranlarda bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin % kristallinite oranı ve β faz fraksiyonu.	47
Çizelge 2.4 : Farklı oranlarda bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin hücre indeks değerleri.	53
Çizelge 3.1 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı kompozit membran doku iskelelerinin döküm çözeltisi bileşimleri	58
Çizelge 3.2 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin % kristallinite oranı ve β faz fraksiyonu.	68
Çizelge 3.3 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin hücre indeks değerleri.	79
Çizelge 4.1 : Üretilen farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı kompozit membran doku iskelelerinin döküm çözeltisi bileşimleri. ...	84
Çizelge 4.2 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı kompozit membran doku iskelelerinin % kristallinite oranı ve β faz fraksiyonu.	98
Çizelge 4.3 : Ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin ALP aktivitesi.	116

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Kemığın hiyerarşik yapısal organizasyonu.	6
Şekil 1.2 : İntramembranöz kemikleşme süreci.....	8
Şekil 1.3 : α , β ve γ faz PVDF yapılarının şematik gösterimi.	14
Şekil 1.4 : PCL'nin kimyasal yapısının şematik gösterimi.	15
Şekil 1.5 : HA ve β -TCP'nin kimyasal yapısının şematik gösterimi.....	16
Şekil 1.6 : BAG'ın kristal yapısı.	19
Şekil 1.7 : Başlıca membran türlerinin şematik gösterimi.....	23
Şekil 1.8 : Membran üretiminde kullanılan temel yöntemlerin şematik gösterimi. ..	24
Şekil 1.9 : Üç bileşenli bir sistemin şematik üçlü faz diyagramı.....	26
Şekil 2.1 : Islak kimyasal yöntem ve ısıtma işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen BCP tozlarının SEM görüntüleri ağı. (a) %0, (b) %0.5, (c)1 ve (d) %2 bor katkılı BCP.....	37
Şekil 2.2 : Islak kimyasal yöntem ve ısıtma işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen BCP tozlarına ait partikül boyut ve yoğunluk değerleri.	38
Şekil 2.3 : Islak kimyasal yöntem ve ısıtma işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen BCP tozlarına ait XRD difraktogramı.	38
Şekil 2.4 : NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen membran doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri.	39
Şekil 2.5 : NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen membran doku iskelelerinin kesit SEM görüntüleri.	40
Şekil 2.6 : Membran doku iskelelerinin FTIR spektrumları.....	41
Şekil 2.7 : Membran iskelelerin temas açısı değerleri: (a) su temas açısı, (b) PBS temas açısı.	42
Şekil 2.8 : Membran iskelelerin şişme değerleri.	44
Şekil 2.9 : Membran iskelelerin çekme dayanımı - % uzama değerleri.	45
Şekil 2.10 : Membran iskelelerin DSC termogramları: a) birinci ısıtma döngüsü, b) kristalizasyon.....	46
Şekil 2.11 : Membran iskelelerin FTIR spektrumları.....	47
Şekil 2.12 : Membran iskelelerin XRD difraktogramları.....	47
Şekil 2.13 : Membran iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyonun ardından SEM görüntüleri	49
Şekil 2.14 : 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağı. %1 bor katkılı membran iskelelerin: (a) SEM görüntüsü; (b) (a)'da belirtilen alanın EDS analiz spektrumu	50
Şekil 2.15 : 3 ve 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağı. %1 bor katkılı membran iskelenin FTIR spektrumu.....	51
Şekil 2.16 : 3 ve 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağı. %1 bor katkılı membran iskelenin FTIR spektrumu.....	52
Şekil 2.17 : Membran iskelelerin sitotoksikite ve hücre canlılık değerleri.....	52
Şekil 3.1 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen ağı. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri	61

Şekil 3.2 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin kesit SEM görüntüleri.....	62
Şekil 3.3 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin PBS temas açısı değerleri	65
Şekil 3.4 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin XRD difraktogramları.	67
Şekil 3.5 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin FTIR spektrumları	68
Şekil 3.6 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin DSC termogramları: a) birinci ısıtma döngüsü, b) kristalizasyon	70
Şekil 3.7 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin çekme dayanımı - % uzama değerleri.	70
Şekil 3.8 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin şişme değerleri.....	73
Şekil 3.9 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyonun ardından SEM görüntüleri	74
Şekil 3.10 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin 14 günlük inkübasyonun ardından (a) SEM görüntüsü; (b) (a)'da belirtilen alanın EDS analiz spektrumu	75
Şekil 3.11 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası FTIR spektrumları	75
Şekil 3.12 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası XRD difraktogramları	76
Şekil 3.13 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin sitotoksisite ve hücre canlılık değerleri	78
Şekil 4.1 : Sol-jel ve ısıtma işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen BAG tozlarına ait SEM görüntüleri.....	90
Şekil 4.2 : Sol-jel ve ısıtma işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen BAG tozlarına ait ortalama partikül boyut ve yoğunluk değerleri	91
Şekil 4.3 : Sol-jel ve ısıtma işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen BAG tozlarına ait XRD difraktogramı	92
Şekil 4.4 : NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri	92
Şekil 4.5 : NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin kesit SEM görüntüleri	93
Şekil 4.6 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin temas açısı değerleri: (a) ön yüzey PBS temas açısı, (b) arka yüzey PBS temas açısı	94
Şekil 4.7 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin XRD difraktogramları	95
Şekil 4.8 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin FTIR spektrumları	97

Şekil 4.9 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin DSC termogramları: a) birinci ısıtma döngüsü, b) kristalizasyon	98
Şekil 4.10 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin çekme dayanımı - % uzama değerleri.	99
Şekil 4.11 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri	101
Şekil 4.12 : Ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelesinin 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen: (a) SEM görüntüsü; (b) (a)'da belirtilen alanın EDS analiz spektrumu	102
Şekil 4.13 : Ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelesinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası elde edilen FTIR spektrumu	103
Şekil 4.14 : Ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelesinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası elde edilen XRD difraktogramı	104
Şekil 4.15 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin şişme değerleri.....	104
Şekil 4.16 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin konsantrasyona bağlı hücre canlılığı değerleri	106
Şekil 4.17 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası floresan mikroskobu görüntüleri.	108
Şekil 4.18 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası SEM görüntüleri	109
Şekil 4.19 : Ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası yüzey ve kesit SEM görüntüleri	112
Şekil 4.20 : 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran iskelelerin: (a) SEM görüntüsü; (b) (a)'da belirtilen alanın EDS analiz spektrumu	112
Şekil 4.21 : 3 ve 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerin FTIR spektrumu.....	113
Şekil 4.22 : Ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin konsantrasyona bağlı hücre canlılığı değerleri.....	114
Şekil 4.23 : Ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası floresan mikroskobu görüntüleri	115

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN BOR KATKILI BİYOSERAMİK/PVDF-PCL KOMPOZİT İSKELELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE *IN VITRO* ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Sunulan tez çalışmasında, sentezlenen kalsiyum fosfat ve kalsiyum silikat esaslı biyoseramik tozların bor ile katkılanması, katkılı tozların poliviniliden florür ve polikaprolaktona dahil edilmesi ile çözücü olmayan indüklenmiş faz ayrımı ve ardından dondurarak kurutma yöntemleri kullanılarak çok çeşitli özelliklerde membran doku iskelelerinin üretimi ve kemik rejenerasyonunu destekleyen alternatif iskelelerin kemik doku oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak tez çalışmasının ilk bölümünde, bor katkılı bifazik kalsiyum fosfat tozları ıslak kimyasal yöntem ve ısıtma işlem proseslerini içeren ardışık yöntem ile sentezlenmiştir. Sentezlenen tozların morfolojisi taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiş, kimyasal yapısı X-ışını kırınımı analizi ile doğrulanmış, parçacık boyut analizi ve yoğunluk ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen farklı oranlarda bor katkılı bifazik kalsiyum fosfat tozlarının poliviniliden florüre dahil edilmesiyle kompozit iskeleler üretilmiş ve üretilen iskelelerin yapısal, morfolojik, termal, mekanik ve biyolojik karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde, çözücü olmayan indüklenmiş faz ayrımı yöntemiyle üretilen seçilen oranda bor katkılı bifazik kalsiyum fosfat ve poliviniliden florür içeren iskelelerde önemli bir üretim parametresi olan koagülasyon banyo sıcaklığının iskelelerin morfolojisi, kristallliği, β -faz oluşumu, mekanik ve biyolojik özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmanın üçüncü bölümünde ise, bor katkılı bağdadit tozları sol-jel ve ısıtma işlem proseslerini içeren ardışık yöntem ile sentezlenmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen bor katkılı bağdadit tozlarının, seçilen koagülasyon banyo sıcaklığında çözücü olmayan indüklenmiş faz ayrımı yöntemiyle üretilen poliviniliden florür esaslı iskeleler üzerindeki etkileri çeşitli karakterizasyonlar ile değerlendirilmiştir. Seçilen oranda bor katkılı bağdadit tozlarının poliviniliden florür ile birlikte polikaprolakton esaslı kompozit iskeleler üzerindeki etkileri, çeşitli testler ile incelenmiştir. Bor katkılı biyoseramik tozlar, kompozit doku iskelelerinin yapısal, morfolojik, termal, mekanik ve biyolojik özelliklerini önemli ölçüde etkilemiştir. Sentezlenen tozlar ile polimer matris arasındaki moleküler etkileşimler ve kimyasal bağların varlığı gösterilmiştir. Üretilen tüm kompozit iskelelerin gözenek yapılarının görülen sınırlar içinde olduğu gözlenmiştir. İskelelerin mekanik dayanımının doğal kemikle mekanik olarak uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, sentezlenen tozların kompozit iskelelere dahil edilmesi, gösterdikleri *in vitro* biyoaktivite ile kompozit iskelelerin apatit büyüme kapasitesini önemli ölçüde desteklediğini ortaya koymuştur. Kompozit iskelelerin *in vitro* sitotoksitesite olmaksızın hücre canlılığı ve çoğalmasını desteklediği, hücre yapışma afinitesi ve biyoyumluluğunun saf poliviniliden florür esaslı iskelelerden daha yüksek olduğu, gerçekleştirilen ileri *in vitro* testler ile gösterilmiştir. Sonuç olarak, üretilen membran formundaki poliviniliden florür esaslı kompozit doku

iskelelerinin, iskele malzemesinden beklenen özellikleri karşılama potansiyelinin yüksek olduğu ve kemik doku mühendisliği uygulamaları için alternatif bir yapı olarak kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bor, Bifazik kalsiyum fosfat, Bağdadit, Poliviniliden florür, Polikaprolakton, Çözücü olmayan indüklenmiş faz ayrımı.



DEVELOPMENT OF BORON-DOPED BIOCERAMIC/PVDF-PCL COMPOSITE SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING AND DETERMINATION OF THEIR *IN VITRO* EFFICACY

SUMMARY

In the presented thesis study, membrane scaffolds with different properties by doping boron to synthesized calcium phosphate and calcium silicate-based bioceramic powders incorporating the powders into polyvinylidene fluoride and polycaprolactone were produced. The aim was to evaluate the bone tissue formation potential of alternative scaffolds that support bone regeneration produced using non-solvent induced phase separation and then freeze drying methods. For this purpose, in the first chapter of the thesis, boron doped biphasic calcium phosphate powders were synthesized by a sequential method including wet chemical technique and heat treatment processes. The morphology of the synthesized powders was examined by scanning electron microscope, the chemical structure was confirmed by X-ray diffraction analysis, particle size analysis and BET density measurements were performed. Composite scaffolds were produced by adding the synthesized boron doped biphasic calcium phosphate powders into polyvinylidene fluoride at different ratios, and structural, morphological, thermal, mechanical and biological characterizations of the scaffolds were performed. In the second chapter of the study, the effects of coagulation bath temperature, which is an important production parameter, on the morphology, crystallinity, β -phase formation, mechanical and biological properties of scaffolds containing boron-doped biphasic calcium phosphate and polyvinylidene fluoride produced by non-solvent induced phase separation method were investigated. In the third chapter of the study, boron-doped baghdadite powders were synthesized and characterized by a sequential method including sol-gel and heat treatment processes. The effects of the synthesized boron-doped baghdadite powders on polyvinylidene fluoride-polycaprolactone scaffolds produced by non-solvent induced phase separation method at the selected coagulation bath temperature were evaluated with various characterizations. The effects of boron-doped baghdadite powders on composites were also investigated with more detailed *in vitro* tests. Boron-doped bioceramic powders significantly affected the structural, morphological, thermal, mechanical and biological properties of composite scaffolds. The molecular interactions and chemical bonds between the synthesized powders and the polymer matrix were demonstrated. It was observed that the pore structures of all the produced composite scaffolds were within the observed limits. It was determined that the mechanical strength of the scaffolds was mechanically compatible with native bone. In addition, the incorporation of the synthesized powders into the composite scaffolds revealed that the *in vitro* bioactivity significantly supported the apatite growth ability of the composite scaffolds. It was shown that by further *in vitro* tests the composite scaffolds supported cell viability and proliferation without cytotoxicity, and that the cell adhesion affinity and biocompatibility were higher than those of pure polyvinylidene fluoride-based scaffolds. As a result, it was evaluated that the produced

membrane form polyvinylidene fluoride-based composite scaffolds have a high potential to meet the expected properties of the scaffold material and can be used as an alternative structure for bone tissue engineering applications.

Keywords: Boron, Biphasic calcium phosphate, Baghdadite, Polyvinylidene fluoride, Polycaprolactone, Non-solvent induced phase separation.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik hasarları, dünya çapında milyonlarca insanın yaşam kalitesini etkileyen önemli sağlık problemleridir. Bu problemler, kemik yapısı ve fonksiyonları üzerindeki genetik anormallikler, yeniden şekillenmede bozukluk, D vitamini eksikliği, fosfor, kalsiyum ve hormonal dengesizlik gibi çeşitli faktörler nedeniyle ortaya çıkmaktadır [1,2]. Kritik boyutlardan küçük yaralanmalarda kemik, kendini yenilenme potansiyeline sahiptir. Kemik greftleri, kendini yenileyemeyeceği kritik hata boyutundan büyük kırık veya kusurlara sahip olan kemiğin fonksiyonlarının eski haline getirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [3,4]. Ancak, greftleme tekniklerinin donör saha ağrısı, inflamasyon, greft reddi, hematoma oluşumu ve patojen geçişi gibi çeşitli dezavantajları vardır [2]. Bu noktada, geleneksel yöntemlerin üstesinden gelebilecek potansiyeli taşıyan bir tedavi yöntemi olarak kemik doku mühendisliği yaklaşımı gündeme gelmektedir [5]. Bu yaklaşım, biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerin etkileşimini temel alan, dokuların en iyi şekilde taklit edilerek fonksiyonel kemik yenilenmesini amaçlayan ve günümüzde üzerinde en çok çalışılan disiplinlerarası bir alanı içermektedir [6].

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak olan biyomalzemelerin üretimi ve doku iskelelerinde kullanılabilirliği dünya çapındaki araştırma grupları tarafından çalışılmaktadır. Hastalıklı kemiğin yapısını ve işlevini eski haline getirmek için kemik benzeri özelliklere sahip yeni biyomalzemelerin geliştirilmesine olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır [7]. Bu durum, biyomalzeme konuları üzerine olan çalışmaların artmasına neden olmaktadır. İdeal doku iskelesi malzemesinin yüksek mekanik mukavemet ve biyouyumluluğa sahip olması bu alandaki zorluklardır [8]. Bununla birlikte, doğal kemik ekstrasellüler matriksteki (ECM) çeşitli makromoleküller aracılığıyla “piezoelektrik” olarak bilinen elektriksel yüzey yükü üretebilir [9,10]. Elektriksel yüzey yükü stimülasyonu ile iskelelerdeki hücrelerin sinyallerle uyarılması, osteoblastik hücrelerin büyümesini, çoğalmasını, farklılaşmasını ve adezyonunu koruyarak kemik rejenerasyonunun desteklenmesinde hayati bir rol oynamaktadır [10,11].

Piezoelektrik biyomalzemeler arasında poliviniliden florür (PVDF), yüksek biyoyumluluk, termal kararlılık, kolay işlenebilirlik ve ferro, piro ve piezo elektrik özelliklerden oluşan üstün elektroaktivitesi nedeniyle geniş bir potansiyel uygulama yelpazesine sahiptir [10-14]. Buna ek olarak, PVDF esaslı doku iskeleleri, doğal ECM'nin yapısını ve elektriksel tepkisini taklit etmenin yanı sıra yeni kemik oluşumunu ve osteojenik hücre farklılaşmasını desteklemesi nedeniyle klinik öneme sahiptir [15-18]. PVDF'nin β fazı, diğer kristal fazlarıyla karşılaştırıldığında en yüksek piezoelektrik özellikleri sunmaktadır [12,13]. Polikaprolakton (PCL) ise, yüksek biyoyumluluğu, biyobozunurluğu ve işlenebilirliğinden dolayı kemik doku uygulamaları için elverişli bir malzemedir [19-23]. Biyoyumluluğu Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan PCL, doku iskelesi malzemesi olarak büyük bir potansiyele sahiptir [23-25]. Bunun yanı sıra, vücutta yeni kemik oluşumuna benzer bir oranda bozunma özelliğine sahip olan PCL'un bozunma kinetiği öngörülebilme ve bozunma yan ürünleri toksik etki göstermemektedir [26-29]. Bununla birlikte, PVDF ve PCL'yi içeren bir doku iskelesinin üretimi, elektroaktif malzemelerin bozunabilirlik ve osteo-iletkenlik avantajlarını ortaya çıkarabilir.

Hastalıklı kemiğin rejenerasyonunda, biyoaktif seramiklerin çeşitli polimer matrislere dahil edilmesi, iskelelerin mekanik ve biyolojik özelliklerini modüle etmek için etkili bir stratejidir [30-32]. Hidroksiapatit (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ve betatrikalsiyum fosfat (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) gibi kalsiyum fosfatlar (CaP), güçlü biyoaktiviteleri, biyoyumlulukları, kimyasal özellikleri ve doğal kemiğin mineral bileşenlerine benzerlikleri nedeniyle biyomalzeme alanında en çok çalışılan seramiklerdir [11,33,34]. HA ve β -TCP'nin özelliklerini alarak elde edilen bifazik kompozit kalsiyum fosfat (BCP) seramikleri, saf HA ve β -TCP'ye göre kemik rejenerasyonunda daha yeteneklidir [35,36]. Ek olarak BCP, gözenekliliği kontrol ederek farklı mekanik konfigürasyonlar elde etmek için uyarlanabilir ve çok işlevli bir malzeme haline getirilmek için diğer malzemelerle birleştirilebilmektedir [34]. Doğal kemik dokusundaki CaP ise, yapısında Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , F^- , Cl^- ve CO_3^{2-} gibi bir çok iyon içerir. Sentetik CaP'e iyon katkılama, kemik hastalıklarının tedavisinde doğal kemiğin gerçekçi bir şekilde taklit edilmesine ve istenen özelliklerde materyallerin üretilmesine katkıda bulunan bir yaklaşımdır [37]. Bununla birlikte kalsiyum fosfatların dezavantajları, kemik ile düşük reaktivite ve vücut içindeki yavaş bozunma olarak sayılabilir. [38]. Kalsiyum silikatlar ise, yüksek biyoaktivite ve mekanik dayanım

göstermelerinden ötürü kemik doku iskelesi olarak kullanım için büyük potansiyeller barındırmakla birlikte, kalsiyum fosfatların alternatifleri olarak görülmektedir [39]. Ayrıca, *in-vitro* ve *in vivo* aktiviteleri karşılaştırıldığı zaman gösterdikleri bozunma hızı, kontrol edilebilir yüksek mekanik özellikleri nedeniyle akermanit ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$), bağdadit ($\text{Ca}_3\text{ZrSi}_2\text{O}_9$) ve mervinit ($\text{Ca}_3\text{MgSi}_2\text{O}_8$) gibi kalsiyum magnezyum silikat esaslı seramiklerin kemik doku uygulamaları için ümit verici olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir [38,40,41]. Özellikle bağdadit (BAG)'ın içerdiği kalsiyum ve silisyumun yanı sıra, sahip olduğu zirkonyum nedeniyle mükemmel mekanik ve biyolojik özellikler ile kalsiyum fosfatlara göre gelişmiş hücre etkileşimi gösterebileceği düşüldüğü için kemik doku uygulamalarında kullanılacak doku iskeleleri için uygun bir malzeme olarak görülmeye başlanmıştır [42]. Diğer bir taraftan, biyoseramik tozlara yapılacak katkıların, tozların özelliklerini ve morfolojilerini değiştirdiği bilinmektedir [43-46]. Özellikle, kemik doku mühendisliğinde kullanılmak için sentezlenen malzemelere yapılan katkıların söz konusu malzemelerin biyoaktivitesini ve mekanik özelliklerini artırdığı yapılan araştırmalarca kanıtlanmıştır [44, 47].

Biyomalzemelere yapılan katkı malzemeleri içerisinde özellikle bor, kemiğin oluşumu, büyümesi ve korunması üzerindeki olumlu etkilerinin yanı sıra birçok biyolojik süreci etkileyen umut verici eser elementlerden biridir [48-50]. Matriste bor elementinin iyon halinde bulunmasının osteoblast benzeri hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde olumlu etkileri mevcuttur [37, 51-53]. Ayrıca bor, moleküller arasında çapraz bağlar kurarak kristal yapıyı güçlendirmekle birlikte, mekanik stabiliteyi arttırmaktadır [54]. Ancak, borun doku iskeleleri üzerindeki piezoelektrik, mekanik ve biyolojik etkisini anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Uygun özelliklere sahip doku iskelelerinin üretiminde kullanılan çok çeşitli teknikler arasında, çözücü olmayan faz ayrımı (NIPS) olarak adlandırılan daldırma çöktürme, farklı iskele morfolojilerinin kontrollü, tekrarlanabilir ve ölçeklenebilir şekilde hazırlanmasını sağlamasıyla öne çıkmaktadır [55]. NIPS yönteminin kullanımı, membran doku iskelelerinin basit ve hızlı bir şekilde üretimine olanak tanınmasıyla oldukça avantajlıdır [14]. Döküm çözeltisinin bileşimi, çözücü ve çözücü olmayan türler, koagülasyon banyosu ortamı ve sıcaklığı gibi membran iskelesinin özelliklerini etkileyebilecek çeşitli koşullar vardır [56]. Bunlar arasında koagülasyon banyosunun sıcaklığı en etkili olanıdır [14]. Koagülasyon banyosunda yüksek sıcaklıklara

çıkmanın istenen yüksek poroziteye sahip asimetrik morfolojinin ortaya çıkmasını kolaylaştırdığı rapor edilmiştir [57]. Bununla birlikte, NIPS yönteminin membranlarda üretimine ait çalışmalar olmasına rağmen, doku iskelesi üretiminde kullanımı ve bu yöntemde sıcaklığın kompozit doku iskelelerinin son özellikleri üzerine etkisi üzerine yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır.

Uygulama açısından çok çeşitli özelliklere sahip doku iskeleleri üretmek amacıyla çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, halen üretim yöntemi ve biyomalzeme ilişkisi tam olarak belirlenememiştir. Geliştirilmiş mekanik dayanıma ve iyileştirilmiş biyolojik özelliklere sahip yapıların alternatif yöntemlerle üretimi, kemik doku uygulamaları için oldukça önemlidir. Sunulan tez çalışmasının amacı, kemik doku yenilenmesini destekleyecek özelliklere sahip bor katkılı BCP/BAG takviyeli PVDF-PCL esaslı doku iskelelerinin üretimi ve kemik doku uygulamalarında kullanılacak membran doku iskelelerinin elde edilmesidir. Bu amaca yönelik olarak, BCP ve bağdadit tozlarının sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen tozlar PVDF'e takviyelendirilerek bu malzemelerin sahip olduğu özelliklerin birleştirilmesi ve bu malzemeler bor ile katkılandırılarak yüksek gözeneklilik içeriği, kuvvetli destek yapısı ve kemikle yüksek bağlanma yeteneği gibi spesifik özelliklere sahip doku iskelelerinin üretimi, NIPS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Böylece, alternatif doku iskelesi geliştirilmesi konusunda hem biyomalzeme hem de üretim yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Tez çalışması kapsamında üretilen mekanik ve biyolojik özellikleri iyileştirilmiş membran doku iskelelerinin, kemik doku mühendisliği uygulamalarında ümit vaat eden bir malzeme olacağı değerlendirilmiştir.

1.1 Genel Bilgiler

Bu bölümde, sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgileri; kemik dokunun yapısı ve özellikleri, kemik hasarlarında tedavi yöntemleri, kemik doku mühendisliği yaklaşımı ve doku iskeleleri olmak üzere dört ana başlık altında özetlenmiştir. İlk bölümde, kemik dokunun yapısı ve özellikleri ile kemik hücreleri ve yeni kemik oluşumu hakkında bilgilere yer verilmiştir. İkinci bölümde, kemik hasarlarında tedavi yöntemleriyle ilgili genel bilgilerin ve üçüncü bölümde kemik doku mühendisliği yaklaşımıyla ilgili açıklamalar yapılmıştır. Bu yaklaşımın temel bileşenlerinden biri olan doku iskeleleriyle ilgili bilgilere ise dördüncü bölümde yer verilmiştir. Buna ek olarak, doku iskelelerinde kullanılan PVDF, PCL

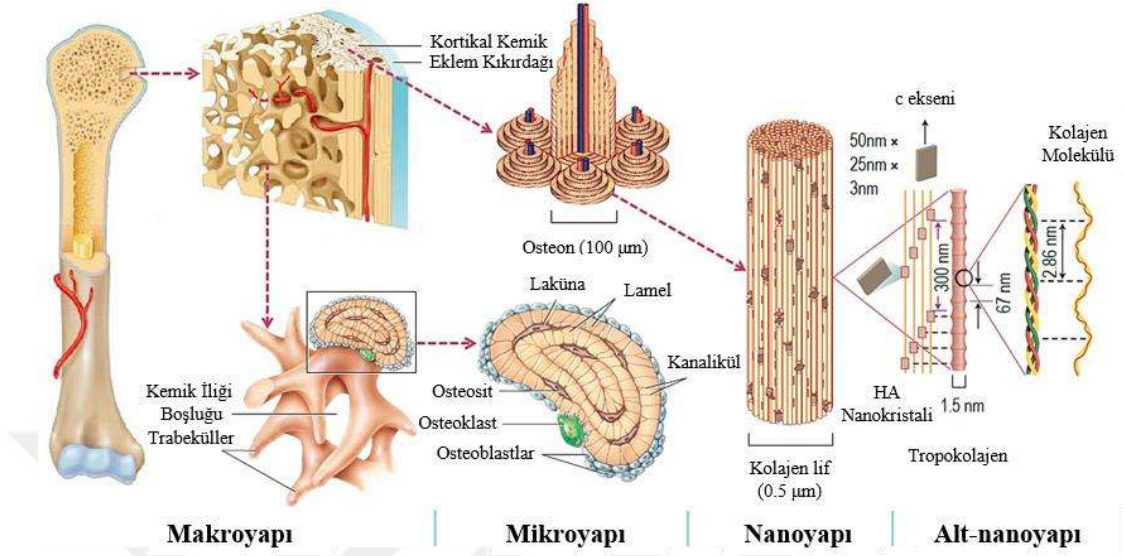
biyopolimerleri ile BCP ve BAG biyoseramiklerinin yapısı, özellikleri ve kemik doku oluşumu üzerine etkilerine yönelik literatür bilgilerinden bahsedilmiştir. Ayrıca, katkı olarak ilave edilen bora değinilmiştir. Doku iskelelerinin üretimi için kullanılan çeşitli yöntemler ve tez çalışması kapsamında kullanılan olan NIPS yöntemi de bu bölümde anlatılmıştır.

1.1.1 Kemik dokunun yapısı ve özellikleri

İskelet sisteminin bir bileşeni olan kemik, yaşam süresince vücudu yapısal olarak desteklemekle birlikte, hareketi kolaylaştırır ve vücuttaki diğer dokuların korunmasını sağlar [58]. Kemik; kemik doku, kemik iliği ve bunları çevreleyen bir bağ doku olan periosteumdan oluşan sert ve dinamik bir dokudur [59]. Makroskaladan alt nanoskalaya kadar kadar değişen ölçeklerde uyum içinde çalışan bileşenleri içeren kemik doku, hiyerarşik bir yapısal düzenlemeye sahiptir [60].

Kemiğin makroskobik yapısı, kortikal (kompakt) ve trabeküler (süngerimsi) kısımlardan oluşur. Kortikal kemik, sert ve yoğun bir kabuk bölgesi olup iskelet kütlelerinin ~%80'ini oluşturur [61]. Uzun kemiklerin dış bölgesini oluşturan kortikal kemik, mekanik ve koruyucu fonksiyondan sorumludur [62]. İskelet kütlelerinin ~%20'sini oluşturan trabeküler kemik ise, uzun kemiklerin orta kısmında bulunur ve metabolik fonksiyonu üstlenir [61,62]. Kemiğin mikroskobik yapısı, sert bir hücre dışı matris (ECM), su ve kemik hücrelerinden oluşur. Oldukça sert bir yapıda olan ECM, düzenli olarak yerleşmiş halkalardan oluşan kanallar ile beslenmeyi sağlar. Bu halkalar, 3-7 µm kalınlığında olup, Havers kanallarının etrafında düzenli dairesel bir yapı oluşturur. Havers kanalları, kan damarları, lenf damarları ve sinirleri içerir. Kemiğin boyuna dik uzanan damarlar ise Wolkman kanalları denilen boşluklara yerleşmiştir. Bu eş merkezli dairesel yapılar, osteonlar, dış zar olan periostun altındaki dış çevresel lameller, iç zar olan endosteumun etrafındaki iç çevresel lameller ve interstisyel lamelleri içerir. Kortikal kemiğin temel birimi olan osteonlar, 200-250 µm çapındaki silindirik yapılar olup, 20-100 µm çapındaki kanalları, bu kanalların etrafındaki 3-7 µm kalınlığındaki lamelleri ve her bir lamelde bulunan lakün ve kanalikülleri kapsar. Dış ve iç fiber katmanlarından oluşan periosteum, kemiğin onarımı, büyümesi ve beslenmesi için önemlidir. Periosteumun dış fiber katmanı, kolajen lifler ve bağ dokunun temel hücreleri olan fibroblastlardan oluşur. Periosteumun içteki katmanında ise, kemiğin ana hücreleri olan osteoprojenitor

hücreler bulunur [63]. Kemik iliği boşluğunu ve kortikal kemiğin kanallarını çevreleyen ince bir bağ dokusu olan endosteum ise, periosteumun altında bulunur [64,65]. Kemiğin hiyerarşik yapısal organizasyonu Şekil 1.1’de sunulmuştur.



Şekil 1.1 : Kemiğin hiyerarşik yapısal organizasyonu [60].

Kemiğin nanoyapısı incelendiğinde ise, kalsifiye ara maddesi olan ECM’nin organik ve inorganik bileşenleri bulunur. Organik yapı, kemiğin kuru ağırlığının ~%35’ini oluştururken, inorganik yapı ~%65’ini oluşturur. Organik bileşenin %90’ını 67 nm aralıklarla yerleştirilmiş 50-70 nm çapında çapraz bağlı liflerden oluşan kolajen tip 1 (COL-I) lifler oluşturur. Kemiğin kompozisyonu Çizelge 1.1’de sunulmuştur.

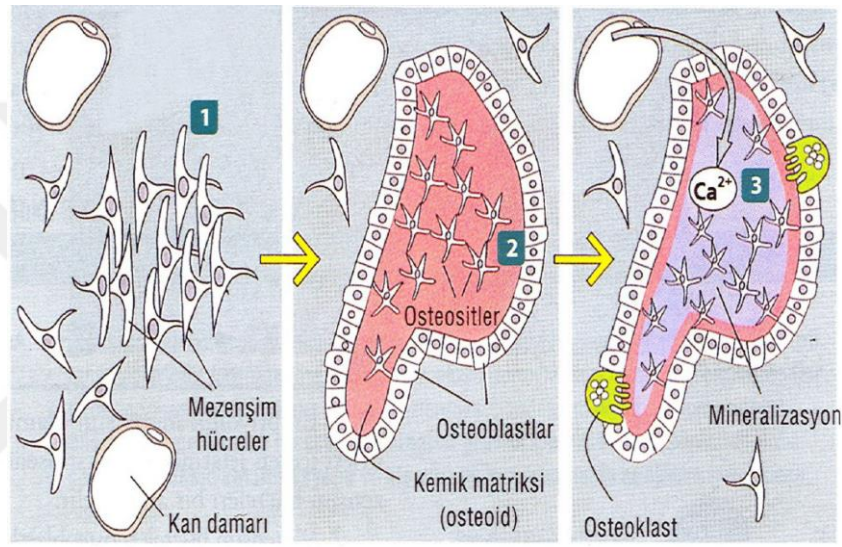
Çizelge 1.1 : Kemiğin kompozisyonu [66].

İnorganik faz	%ağ.	Organik faz	%ağ.
Hidroksiapatit	~ 60	Kolajen	~ 20
Karbonat	~ 4	Su	~ 9
Sitrat	~ 0,9	Kolajen olmayan proteinler (osteokalsin, osteonektin, osteopontin, trombospondin, morfogenetik proteinler, siyaloprotein, serum proteinleri)	~ 3
Sodyum	~ 0,7		
Magnezyum	~ 0,5		
Diğer eser elementler: Cl^- , F^- , K^+ , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}		Diğerleri: Polisakkaritler, lipidler, sitokinler	
		Birincil kemik hücreleri: osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar.	

1.1.1.1 Kemik hücreleri ve yeni kemik oluşumu

Kemik, sert ve mineralize bir doku olmasına rağmen kan damarları ve çeşitli hücre tiplerini içeren canlı bir dokudur [67]. Kemik dokunun oluşumu, sürekliliği ve yeniden düzenlenmesinde görev alan hücre tipleri, osteoprojenitör (osteoblast öncülü) hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır. Osteoprojenitör hücreler, gelişmekte olan embriyoda görülen bağ dokusunda bulunan mezenkimal hücrelerden köken alan ve organik matriste kemiğin korunmasını sağlayan hücrelerdir. Bu hücre tipleri, periosteumun iç tarafında, endosteum ve haversian kanallarında bulunurlar. Şekil olarak fibroblastlara benzeyen osteoprojenitör hücrelerin bir kısmı, kemiğin büyüme döneminde mitoz bölünme ile farklılaşarak mezenkimal hücrelerden osteoblastlara dönüşürler [67]. Osteoprojenitör hücrelerden köken alan osteoblast hücreleri, tip 1 kolajen, glikoproteinler, proteoglikanlar ile osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi organik matris bileşenlerinin sentezinden sorumludur. Osteoblastlar endoplazmik retikulum, golgi ve salgı veziküllerine sahip olup, sentezledikleri organik matris bileşenlerinin yanı sıra osteoblastların aktif olduklarını gösteren önemli bir enzim olan alkalın fosfataz (ALP) salgırlar. Bu enzim, kalsiyumun kalsiyum fosfat halinde matriste çökmesini sağlayarak matrisin kalsifikasyonunda (kireçleşmesinde) görev alır. Matris kalsifiye olduğunda, laküna adı verilen boşlukta osteoid adı verilen kalsifiye olmamış doku ile ayrılır. Kısa uzantılarla komşu osteoblastlara tutunan osteoblast hücreleri, salgıladıkları bu osteoid doku içerisinde gömülü kalarak matris kalsifiye olduğunda metabolik faaliyetlerini azaltırlar. Osteoblastların etrafı salgıladığı ECM ile çevirilince osteoblastlar, osteositlere dönüşür [67,68]. Kalsifiye matris içerisinde kalan, metabolik faaliyetleri azalan osteoblastlardan farklılaşan ve osteoblastlar gibi bölünme yetenekleri bulunmayan osteositler, olgun kemikte en fazla bulunan hücre tipidir. Sitoplazmik uzantılara sahip olan osteositler, komşu osteosit hücreleriyle iyon ve molekül alışverişi gerçekleştirirler. Ayrıca, kalsifiye matriste besin maddelerini, kalsitonin, paratiroid gibi hormonlarını ve siklik adenozin fosfat, insülin benzeri büyüme faktörlerini salgılayarak hücreden hücreye transdüksiyonu sağlarlar. Kemik dokunun canlı kalabilmesi osteositlerin varlığı ile mümkündür. Yaşlanıp ölen osteositlerin bulundukları yerdeki matris bozulmaya başlar ve osteoklastlar tarafından eritilip rezorbe edilir. Osteoklastlar, makrofaj ve monositlerin öncülü olan granülosit-makrofaj koloni oluşturma birimleri olarak bilinen kemik iliği hematopoietik kök hücrelerinden köken alan hücrelerdir [69]. Kandan gelen

monositlerin birleşmesi ile oluşan osteoklastlar, mitoz bölünme ile çoğalır. Osteoblastlar, içerdikleri lizozomal enzimleri sitoplazmik uzantılar bulunan yüzeylerinden hücre dışına vererek kemiği eritmeye çalışırken, kemik rezorpsiyonun olduğu bölgelerde Howship lakünaları adı verilen çukurlar açarlar. Bu esnada yeni kemik doku da yapabilen osteoblastlar, kemik dokunun yaşlanıp yıpranan kısımlarını ortadan kaldırıp yerine yenisini yapabilmesini sağlarlar. Kemik rezorpsiyonundan sonra, apoptozis olarak bilinen hücre ölümüne uğrarlar [67,70]. Kemikleşme olarak da bilinen yeni kemik oluşumu, intramembranöz ve endokondrial olmak üzere iki farklı süreçle gelişir [66].



Şekil 1.2 : İntramembranöz kemikleşme süreci [71].

İntramembranöz kemikleşme, embriyodaki mezenkimal bağ dokusu yapısından farklılaşarak oluşan kemik oluşumudur. Bu tip kemik oluşumu; organizmada kafatası, sternum, pelvis gibi yassı kemikler, yüz kemikleri, mandibula ve maksillanın bazı bölümleri ile kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında görülür. Mezenkimal hücreler, osteoblastlara farklılaşarak kemik matrisi oluştururlar. Oluşan kemik spikülleri ve trabeküler kemik yapıları, primer kemik merkezi olarak adlandırılır. Kalsifikasyon ve osteoid oluşumunda sonra, matris içinde kalan osteoblastlar osteositlere dönüşür. Kalsifiye olmayan iç ve dış kısımlarda ise mezenkimal hücreler, periosteum ve endosteuma dönüşerek kompakt tabakayı oluştururlar. Mezenkimal hücrelerin mitoz bölünerek çoğalması ile osteoprojenitör hücreler ve osteoblastlar oluşarak, yeni kemik oluşumunu devam ettirirler. Özetle, intramembranöz kemik oluşumu, kan damarları etrafında kümeleşen mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşerek kemik matrisini şekillendirmesi ve kapillerden osteoid dokuya kalsiyum ve

fosfat iyonları taşınması ile kalsifikasyonun sağlanması şeklinde gerçekleşir [71]. İntramembranöz kemikleşme süreci Şekil 1.2’de şematize edilmiştir.

Endokondrial kemikleşme ise, hiyalin kıkırdak bir iskeletin oluşmasını takiben bu yapının büyüyerek rezorbsiyonun gerçekleşmesi ile kemik oluşumudur [6, 72]. Bu tip kemik oluşumu; vertebral kolon, pelvis ve ekstremitte kemiklerinde görülür. Endokondrial kemikleşmede, hiyalin kıkırdak modelin oluşumunun ardından kıkırdak matrisini üreten hücreler olan kondrositler, hücre büyümesi nedeniyle hipertrofi olarak bilinen, dokunun lokal bir genişleme göstermesi sonucu kalsifiye hale gelir. Kıkırdak modelin diyafiz bölgesinde, kıkırdağı örten perikondrium damarlanır. Buradaki mezenkim hücreleri bölünerek osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklılaşırlar [67,73]. Yeni osteoblastlar, kemik matrisi salgılar ve osteositlere dönüşürler. İntramembranöz kemikleşme yoluyla kondrositlerin dejenere olmalarına neden olan bir kemik manşet oluşur. Bu dejenerasyonun sebebi, oluşan kemik manşetin perikondriumdaki kan damarlarından çıkan besin maddelerinin difüzyonunu engellemesi ve bu yolla beslenen kondrositlerin beslenemeyip bozulmalarıdır. Bu sırada periosteum olarak adlandırılan kemik mantesini saran zarda beliren osteoklastlar ile periosteal delikler açılır. Bu delikler, osteoprogenitör hücreler, hematopoetik hücreler ve kan damarları ile kıkırdak modele gerekli besin ve oksijen sağlar. Damarlarla gelen kalsiyum ve fosfat iyonlarının alkalen fosfataz aracılığıyla birleşip kıkırdak matrise çökmesiyle diyafizde bir kemikleşme merkezi oluşur. Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşması ve osteoblastların kemik matrisi salgılaması ile birincil kemikleşme (ossifikasyon) merkezi şekillenir. Bu kemikleşme merkezinin büyümesi sırasında aktif halde olan osteoklastlar, kemik doku üzerindeki ignemsi çıkıntılar olan spikülleri rezorbe ederek kemik iliği boşluğunu meydana getirirler. Bu boşluk, kıkırdak modelin kemikleşmesi ve uzaması tamamlanıncaya kadar epifizlere doğru büyür. Bu işlem ilerledikçe epifizyal plaklar dışındaki kıkırdaklar kemikleşmiş olur. Epifiz kısımlarındaki ikincil kemikleşme, diyafizlerdeki kemik oluşumu dışında aynı şekilde gerçekleşir. Birincil ve ikincil kemikleşme merkezleri arasında bulunan epifiz kıkırdağını yapan osteoprogenitör hücreler benzer süreçle osteoblastlara dönüşerek kıkırdak matrisini sentezler. Oluşan kıkırdak doku, devamlı olarak yerini kemik dokuya bırakır [67,71,74].

1.1.2 Kemik doku mühendisliği yaklaşımı

Kemik dokunun dinamik yapısı, sağlıklı durumunu korumaya, mekanik yükler değiştiğinde kemiğin mimarisini uyarlamaya ve yaşam boyunca devam eden yeniden şekillendirme süreciyle hasarlı kısımları onarmaya olanak tanır [75]. Ancak, kemiğin kendi kendini yenileme potansiyeli, travma, enfeksiyon, kemik tümörleri, kemiğin rezeksiyonu, psödoartroz, doğuştan gelen genetik bozukluklar veya yaşlanma nedeniyle oluşan kritik boyutlu kemik hasarlarının onarımında yetersiz kalmaktadır [76]. Bu hasarlar çoğu zaman hastaların acı duymasına ve hareket güçlüğü çekmesine neden olarak yaşam kalitesini son derece etkilemektedir. Kemik, kandan sonra nakledilen ikinci dokudur [76]. Greftleme, kendini yenileyemeyeceği kritik hata boyutundan büyük kırık veya kusurlara sahip olan kemiğin fonksiyonlarının eski haline getirilmesinde yaygın olarak kullanılan kemik nakli tekniğidir. Geleneksel kemik nakli teknikleri içerisinde öne çıkan otoplast (hastanın kendisinden elde edilen) ve alloplast (başka bir vericiden alınan) kemik nakli, hastaya ikinci bir cerrahi işlem yapılmasına ihtiyaç duyulması, hasarlı alanın büyüklüğü nedeniyle yeterli greftin alınamaması, greft reddi, inflamasyon ve patojen geçişi gibi çeşitli dezavantajları nedeniyle etkin bir tedavi sağlayamamaktadır [2]. Diğer bir taraftan, kemik hasarlarının tedavisinde kullanılan kemik çimentosu, çeşitli metaller ve sentetik polimerler gibi malzemeler aşınmakta ya da doğal kemik gibi davranmamaktadır. Bu noktada, geleneksel yöntemlerin sınırlamalarının üstesinden gelebilecek potansiyeli taşıyan bir tedavi yöntemi olarak “kemik doku mühendisliği yaklaşımı” gündeme gelmektedir [5]. “Doku mühendisliği” kavramı, Kaliforniya’da düzenlenen bir Ulusal Bilim Vakfı çalıştayında ortaya çıkmış ve daha sonra Langer ve Vacanti tarafından yeniden gözden geçirilmiştir [6]. Süreç, dokuya özgü olabilen hücreler, kök hücreler veya embriyonik kök hücreler (otolog veya allojenik); lif, köpük veya hidrojel gibi farklı formlarda olabilen matrisler (doğal veya sentetik); ve statik veya dinamik akış koşullarında olabilen *in vitro* kültür sistemleri olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Ayrıca, doku mühendisliği ürünlerinin, mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesini olarak tanımlanan anjiyogenezi artırabilecek veya yeni doku oluşumuna yardımcı olabilecek büyüme faktörlerinin salımı için kontrollü ilaç yükleme yöntemlerinin avantajına sahip olabileceği de belirtilmiştir. Kemik doku mühendisliği, biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerin sinerjik bir şekilde bir etkileşimini temel alan ve hasar gören dokuların laboratuvar koşullarında biyolojik

replasmanlarını en iyi şekilde oluşturarak fonksiyonel kemik yenilenmesini amaçlayan disiplinlerarası bir alandır [77]. İşlevsel dokular oluşturmak için üç boyutlu destek yapılarının geliştirilmesi, bu yaklaşımın temel hedeflerinden biridir.

1.1.3 Doku iskeleleri

Kemik doku mühendisliği yaklaşımının üç temel bileşeninden biri olan doku iskeleleri, kemiğin üç boyutlu hücre dışı matrisine benzer olarak tasarlanan yapılardır. Doku iskelelerinin kullanımı hasarlı bölgeye yapısal destek sağlamakla birlikte, hücreler için uygun bir mikro ortam sağlama, biyolojik değişikliklere cevap vermek için hücre içi sinyaller ile çevre doku ile etkileşim kurma ve doğal hücre dışı matrisin yeniden oluşumunu desteklemektedir [77].

Kemik doku rejenerasyonu için geliştirilen iskelelerin vücut içerisinde fonksiyonel ve güvenli olarak kullanımı için bazı özelliklere sahip olması gerekir. Bu özelliklerden en önemlisi, biyouyumluluktur. Biyouyumluluk, biyomalzemelerin canlı dokular ile bir araya geldiğinde toksik etki yaratmadan işlevini yerine getirmesi, diğer bir deyişle vücutla uyuşabilir olmasıdır. Biyoaktiflik, *in vitro* koşullar altında kemik dokuyla doğrudan bağ oluşturma yeteneği olup, doku iskelelerinden beklenen bir diğer özelliktir. Biyoaktif özellikteki doku iskeleleri, hücrelerin uyarılması ve hedefe yönelik metabolitlerin aktif hale gelmesiyle doku yenilenmesini olumlu yönde etkilemektedir. Ayrıca, iskelelerin içsel bağlantılı ve kontrol edilebilir gözenekliliğe sahip olması, hücre canlılığı için gerekli besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlayacak hücre göçüne izin verebilir. Uygun gözeneklilik ve gözenek dağılımının homojenliği; hücre tutunması ve doku gelişimi için özgül yüzey alanını artırmada önemli değişkenlerdir [78]. Bununla birlikte, kemik doku yenilenmesinin amaçlandığı uygulamalarda kullanılan biyomalzemelerin osteoinduktif olması, yani olgunlaşmamış osteoprojenitör hücrelerin preosteoblastlara farklılaşmasını tetikleyerek yeni kemik oluşumunu uyarıcı özellikte olması beklenir. Ayrıca, doku iskeleleri hücrelerin üremelerini destekleyerek kemiğin üç boyutlu yapısının oluşmasını sağlayan osteokonduktif özellik sergilemelidir [79]. Hücreler kendi hücre dışı matrislerini oluşturacak kapasiteye ulaştıklarında ve doku oluşumu tamamlandığında, doku iskelelerine ihtiyaç kalmayacaktır. Bu nedenle, doku iskeleleri işlevlerini yerine getirdikten sonra yeni doku oluşumunu takiben biyolojik olarak parçalanabilmeli, yani biyobozunur özellik göstermelidir. Dolayısıyla, iskelenin

bozunma hızının yeni doku oluşum hızı ile eş zamanlı olması kritiktir [80]. Bozunmanın ardından ortaya çıkan yan ürünler toksik olmamalı ve diğer organlarla etkileşime girmeyip metabolizma içerisinde kaybolmalıdır. Bu özelliklerin yanı sıra, kemiklerin iskelet sistemi için sağladığı destek göz önünde bulundurulduğunda doku iskelelerinin kemiğe uygun bir mekanik dayanım göstermesi gerekir. Kemiğin biyomekanik özellikleri Çizelge 1.2’de özetlenmiştir. Bu özelliklere sahip iskelelerinin uygun biyomalzemeler seçilerek üretimi, kemik doku mühendisliği uygulamaları için oldukça önemlidir.

Çizelge 1.2 : Kemiğin biyomekanik özellikleri [66].

Mekanik Özellikler	Kortikal Kemik	Süngerimsi Kemik
Young modülü (GPa)	14-20	0,05-0,5
Çekme dayanımı (MPa)	50-150	10-20
Basma dayanımı (MPa)	170-193	7-10
Kırılma tokluğu (MPa m ^{1/2})	2-12	0,1
Yorulma dayanımı	1-3	5-7
Yoğunluk (g/cm ³)	18-22	0,1-1,0
Görünür yoğunluk (g/cm ³)	1,8-2,0	0,1-1,0
Yüzey/kemik hacmi (mm ² /mm ³)	2,5	20
Toplam kemik hacmi (mm ³)	1,4 x 10 ⁶	0,35 x 10 ⁶

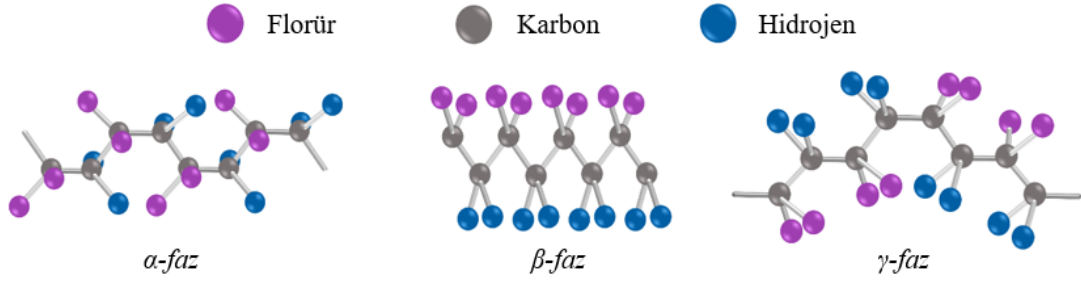
1.1.3.1 Doku iskelelerinde kullanılan biyomalzemeler

Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla kullanılan doğal yada sentetik malzemelerdir [81]. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında çok çeşitli biyomalzeme türü ve kombinasyonu kullanılmaktadır. Seçilen malzemenin, yerine geçeceği dokuya benzer özellikler göstermesi gerekir. Doğal kemik dokunun organik ve inorganik bileşimi göz önüne alındığında, metalik biyomalzemeler, polimerik biyomalzemeler, seramik biyomalzemeler ve kompozit biyomalzemeler kemik doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [82]. Bununla birlikte, metalik biyomalzemelerden üretilen iskeleler mevcut olmasına rağmen, metallerin biyolojik ortamda bozunur olmama, insan vücudunda korozyona uğrama ve sınırlı işlenebilirlik gibi dezavantajları doku iskelelerinde kullanımlarını sınırlamaktadır [83]. Diğer bir taraftan, polimerik ve seramik biyomalzemelerin bir arada kullanımıyla doğal kemik yapısına benzer özellikler gösteren kompozit yapılar elde edilebilmektedir [77].

Polimerler, kovalent bağlarla birleştirilmiş uzun atom zincirlerinden oluşan organik malzemeler olup, doku iskelesi üretiminde öncüdür [82]. Doğal olarak türetilen polimerler ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılabilir. Nişasta, aljinat, kitin/kitosan, ve hiyaluronik asit türevleri gibi polisakkaritleri ve soya, kolajen, fibrin jeller ve ipek gibi proteinler doğal polimerlerdendir [84]. Hayvanlar ve bitkilerden elde edilen doğal polimerler, biyolojik ortamdaki makromoleküllere gösterdikleri benzerlik sayesinde biyouyumluluk ve düşük sitotoksikite göstermelerinin yanı sıra, hücresel aktiviteleri olumlu şekilde etkilemektedir [78]. Bununla birlikte, doğal polimerleri farklı biyolojik kaynaklardan edinme ve işleme zorunluluğu ticarileşmelerini etkileyen bileşimsel değişkenlikle ilgili çeşitli sınırlamalara neden olmaktadır [82]. Ayrıca, düşük mekanik özelliklere sahip olmaları kullanım alanlarını kısıtlamaktadır [78, 83].

Doğal polimerlerle karşılaştırıldığında sentetik polimerler, daha iyi mekanik özelliklere ve işlenebilirliğe sahiptir. Sentetik polimerler, sistemin özelliklerinin belirli bir uygulamanın gereksinimlerine göre uyarlanmasını kolaylaştıran kimyasal modifikasyonlar ve moleküler değişiklikler için daha fazla olasılık sunar. Poli(l-laktik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit), poli(propilen fümarat), poli(viniliden florür) ve poli(ϵ -kaprolakton) gibi polimerler, sentetik polimerlerdendir [82].

Sentetik polimerler arasında poli(viniliden florür) (PVDF), karmaşık bir yarı kristal yapıya sahip bir termoplastiktir. Kimyasal formülü $[-CH_2-CF_2-]_n$ olup, ağırlık %59,4 flor ve %3 hidrojen içerir [85,86]. Florür atomlarının varlığı ve polimer zincirindeki asimetri, güçlü bir dipol momentini yaratır. Lamel şeklindeki kristalitler, küresel olarak simetrik polikristalin agregalar olan sferolitlere hizalanmıştır [12, 86]. PVDF'in bağıl geçirgenliği 6-12 ve piezoelektrik sabiti (d_{33}) -24 ila -34 pC/N⁻¹ aralığındadır [12]. α , β , γ , δ ve ϵ olmak üzere beş farklı kristalin polimorfa sahip olan PVDF'in β -fazı TTT (all-trans), α ve δ fazları TGTG' (trans-gauche-trans-gauche) ve γ ve ϵ fazları T3GT3G (triple trans-gauche) gibi farklı zincir konformasyonlarıyla ilişkilidir. Ayrıca, β , γ ve δ fazları polar yapıya sahip olup, α ve ϵ fazları kafes içindeki dipollerin antiparalel paketlenmesi nedeniyle polar yapıda değildir [86,87]. PVDF'in α , β ve γ fazlarının farklı zincir konformasyonlarının şematik gösterimi Şekil 1.3'te verilmiştir.

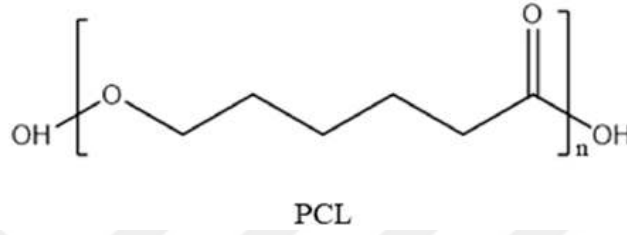


Şekil 1.3 : α , β ve γ faz PVDF yapılarının şematik gösterimi [88].

PVDF'in sahip olduğu yüksek biyouyumluluk, termal kararlılık, işlenme kolaylığı ve ferro, piro ve piezoelektrik özelliklerinden oluşan üstün elektroaktivitesi kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanım için ilgi görmesini sağlamıştır [10-14]. PVDF esaslı iskeleler doğal ECM'nin yapısını ve elektriksel tepkisini taklit edebildikleri için yeni kemik oluşumu ve osteojenik hücre farklılaşmasını teşvik edebilir [16-18]. PVDF'in β -fazı, diğer kristal fazlarla karşılaştırıldığında en yüksek piezoelektrikliği sergilemektedir [12,13,86]. β -PVDF'nin piezoelektrik özelliğinin hücre davranışı üzerindeki etkileri ile ilgili çok çeşitli çalışmalar mevcuttur. M.T.Rodrigues ve çalışma ekibi [89], keçi iliği hücrelerinin (GMC) büyümesi ve osteoblastlara farklılaşması için β -PVDF membranlarını karakterize etmiştir. β -PVDF'nin piezoelektrik özelliğinin GMC'lerin yapışmasını ve çoğalmasını sağlamanın yanı sıra, bunların osteojenik fenotipe doğru farklılaşmasını arttırdığı raporlanmıştır. Ribeiro ve çalışma ekibi [90], elektroaktif β -PVDF filmlerin substrat polarizasyonunun, insan adipoz kök hücrelerinin daha yüksek osteojenik farklılaşması için gerekli elektromekanik uyarıları sağlayabileceğini ve böylece farklı kemik rejenerasyon stratejilerini geliştirebileceğini bildirmiştir. Bununla birlikte, mevcut PVDF esaslı iskelelerin çoğu tek başına ideal biyolojik olarak parçalanabilirlik, fizyolojik olarak esneklik, hücre etkileşimini desteklemek için hidrofilitate ve yarı geçirgenlik gibi önemli özelliklerin tümünü sağlayamamaktadır [3,15]. Polimer karıştırma (blending), kemik doku mühendisliği uygulamalarının gereksinimlerini karşılayan işlevsel malzemeler geliştirmek için elverişli bir yaklaşımdır [8]. Önceki araştırmalar, PVDF esaslı iskelelerin farklı polimerlerle karıştırılmasının, istenen özelliklere sahip yeni malzemelerin üretilmesine olanak sağladığını göstermiştir [4].

Bir diğer sentetik polimer olan polikaprolakton (PCL), yüksek biyouyumluluğu, uygun mekanik özellikleri (yüksek mukavemet ve tokluk, moleküler ağırlığına bağlı olarak değişen elastikiyet), termal kararlılığı, kolay işlenebilirliği ve toksik olmayan bozunma ürünleri nedeniyle PVDF ile karışım için iyi bir seçenektir [91-94]. PCL, Gıda ve İlaç

Dairesi (FDA) tarafından onaylı bir polimer olup, kolay bulunabilirliği, maliyet etkinliği ve modifikasyona uygunluğu ile kemik iyileşme sürecini kolaylaştıran yenilikçi iskelelerin geliştirilmesine yönelik yoğun araştırmaların konusudur [95,96]. Yarı kristalin alifatik bir polyester olan PCL'nin erime sıcaklığı (T_m) insan vücut sıcaklığının üzerinde olup, 59 ile 64 °C arasında değişmektedir. Camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ise -60 °C'dir. Kimyasal formülü $[-OC(O)C_6H_{10}-]_n$ olup, ϵ -kaprolaktonun bir katalizörle (örneğin oktanoik kalay) halka açma polimerizasyonu yoluyla sentezlenir. PCL'nin kimyasal yapısı Şekil 1.4'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.4 : PCL'nin kimyasal yapısının şematik gösterimi [97].

PCL, polar olmayan beş metilen grubu ve nispeten daha polar bir ester grubu içermektedir. Alifatik-ester bağının hidrolitik olarak kararsız olması ve hidrolize yatkınlığı nedeniyle biyobozunur özelliğe sahip olup, fizyolojik koşullar altında ise mikroorganizmalar tarafından bozunur [96]. PCL'nin sahip olduğu bu özellikler, alifatik poliesterlerle kopolimerlerinde ve diğer polimerle uyumlu olmasını ve karışarak blending oluşturabilmesini sağlar. PVDF ve PCL'nin birarada kullanımıyla doğal kemik dokunun sahip olduğu biyouyumluluk, uygun bozunurluk, yüksek mekanik mukavemet ve piezoelektrik etki gibi özelliklere benzer özelliklerde iskelelerin üretimi mümkündür. Bununla birlikte, sentetik polimerlerin özellikleri çeşitli biyoseramik malzemelerin polimer matrise dahil edilmesi ile geliştirilebilmektedir [98].

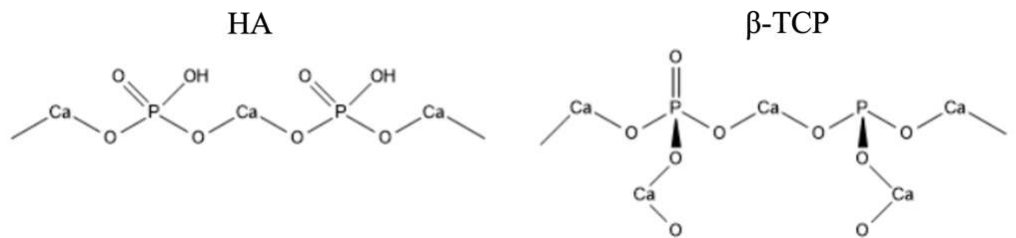
Biyoseramikler, yapılarındaki iyonik bağlar nedeniyle yüksek erime sıcaklıkları, düşük elektrik ve ısı iletimi ile yüksek sertlik gösteren inorganik malzemelerdir. Doku ile etkileşim biçimine göre biyoinert ve biyoaktif olarak sınıflandırılabilir [99]. Biyoinert seramikler kimyasal olarak kararlı olup, konakçı doku ile herhangi bir tepkimeye girmezler. Bu nedenle, diş implantları ve kalça protezleri gibi vücuda yerleştirildikten sonra uzun süre aşınmaya ve yıpranmaya karşı yüksek direnç göstermesi gereken uygulamalarda tercih edilirler. Alümina (Al_2O_3) ve zirkonya (ZrO_2) biyoinert seramiklerdendir. Biyoaktif seramikler ise, kimyasal olarak aktif

olup, temas halinde olduğu doku ile biyokimyasal bağ oluşumunu indüklemeye potansiyeline sahiptir. Çözünürlüklerine göre biyoaktif seramikler, biyolojik olarak emilebilir ve emilemeyen olarak gruplandırılabilir. Biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanılan biyoaktif seramikler, kalsiyum fosfatlardır [99]. Hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP), okta kalsiyum fosfat (OCP) ve bifazik kalsiyum fosfat (BCP) gibi seramikler en yaygın kullanılan kalsiyum fosfat esaslı biyoseramiklerden olup, kimyasal içerikleri Çizelge 1.3'te sunulmuştur.

Çizelge 1.3: Bazı kalsiyum fosfat esaslı biyoseramiklerin temel özellikleri [100,101].

Kalsiyum fosfat	Kimyasal formül	Molar oran (Ca/P)	Yoğunluk (g/cm ³)	Çözünürlük (25 C, mg/L)
Hidroksiapatit	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	3,01	~ 0,3
α-trikalsiyum fosfat	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	3,16	~ 2,5
β-trikalsiyum fosfat	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	3,07	~ 0,5
Okta kalsiyum fosfat	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	1,33	2,61	~ 8,1

Kalsiyum fosfatlar, biyoaktif özelliğe sahip olup kemiğe yüksek oranda bağlanma yeteneğine sahiptir [102]. Diş ve kemiklerin inorganik kısmına kimyasal ve kristal yapı olarak benzerlik gösteren bu kalsiyum fosfatlar, biyouyumlu, osteokonduktif ve osteoindüktiftir [32,102]. Bu özellikleriyle kalsiyum fosfatlar, kimya, biyoloji ve tıp gibi pek çok disiplinlerarası alanda uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır [77]. Kalsiyum fosfatlar arasında bifazik kalsiyum fosfat (BCP), HA ve β-TCP'nin farklı oranlarda karışımından oluşmaktadır. Vücut ortamında daha kararlı olan HA ve daha çözünür olan β-TCP'nin özelliklerinin birleştirilmesiyle elde edilen BCP, kemik rejenerasyonunda saf HA ve β-TCP'ye göre daha yeteneklidir [35,36,103,104]. BCP'nin HA/β-TCP oranı kontrol edilerek bulundukları doku içerisindeki bozunma kinetiği ve emilim oranı öngörülebilmektedir. Şekil 1.5, BCP'nin kimyasal yapısını göstermektedir.



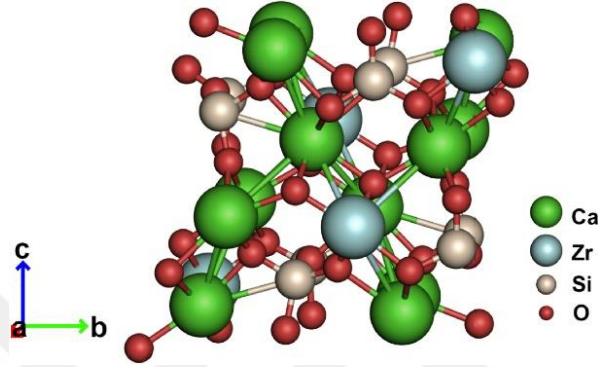
Şekil 1.5 : HA ve β-TCP'nin kimyasal yapısının şematik gösterimi.

BCP, kalsiyumdan yoksun hidroksiapatitin ıslak kimyasal yöntem veya çöktürme sonrası kalsinasyon işlemiyle HA'ya ve β-TCP'ye ayrıştırılması sonucu sentezlenir.

Ayrıca, dikalsiyum fosfat dehidrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve CaCO_3 ile monokalsiyum fosfat monohidrat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ve CaCO_3 'ın yüksek sıcaklıklardaki katı hal reaksiyonunun ardından 700 °C veya üzeri sıcaklıklarda sinterlenmesi ile de BCP sentezi mümkündür. Bir diğer yöntem olarak, sentetik HA ve β -TCP'nin çeşitli oranlarda mekanik olarak karıştırılması ve ardından kalsinasyonu ile de BCP üretilir [105,106]. Ayrıca, BCP'nin doğal kaynaklardan sentezlenerek üretilmesine yönelik çalışmalar da mevcuttur [107]. Piccirillo ve çalışma ekibi [108], morina ve kılıç balığı kemiklerini toz haline getirdikten sonra 1000 °C'de ısıtma işlemi uygulamış ve BCP elde etmiştir. Bununla birlikte, üretim parametrelerindeki değişimlere bağlı olarak BCP doku iskelelerinin gözeneklilik, mukavemet ve biyolojik özelliklerini ayarlamak mümkündür [109]. BCP sentezinde HA/ β -TCP oranında sağlanan optimal dengeyle birlikte fizyolojik ortamdaki kalsiyum (Ca^{+2}) ve fosfat (PO_4)⁻³ iyonlarının kademeli olarak çözünmesiyle yeni kemik oluşumu gerçekleşir [110]. BCP'ler yeterli bozunmaya, mükemmel biyouyumluluğa, yüksek osteokondüktiviteye ve osteoindüktiviteye sahip olduklarından doku iskelesi malzemesi olarak büyük bir potansiyele sahiptir [111]. Chen ve çalışma ekibi [112], dexamethasone yüklü BCP/kolajen esaslı doku iskelelerinin insan kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücrelerinin (hMSC'ler) proliferasyonu ve osteojenik farklılaşması üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Ayrıca, üretilen iskelelerin atimik çıplak farelerin sırt bölgesine deri altı implantasyonu ile ektopik kemik dokusu rejenerasyonu üzerindeki destekleyici etkilerini incelemiştir. Elde edilen sonuçlar, iskelelerin birbirine bağlı kontrollü gözenek yapısı, yüksek mekanik mukavemet, iyi biyouyumluluk ve *in vitro* kültür ve *in vivo* implantasyon sırasında hMSC'lerin osteojenik farklılaşmasını ve yeni kemik dokusu rejenerasyonunu uyardığını ortaya koymuştur. Bir diğer çalışmada Thuaksuban ve çalışma ekibi [113], PCL/BCP iskelelerinin hayvan modellerinde biyouyumluluk ve bozunma davranışlarını değerlendirmiş ve üretilen iskelelerin sahip olduğu özelliklerin ticari PCL/trikalsiyum fosfat iskeleleriyle karşılaştırılabilir olduğunu raporlamıştır. Yakın zamanda Wu ve çalışma ekibi [112], polietereeterketon (PEEK) üç boyutlu gözenekli iskeleleri üzerine BCP'nin etkilerini incelemiştir. *In vitro* ve *in vivo* değerlendirmelerin sonuçları, BCP'nin varlığının PEEK iskelelerinin osteojenik kapasitesini önemli ölçüde artırdığını ve belirgin kemik büyümesinin gözlemlenebildiğini göstermiştir.

Diğer bir taraftan, kalsiyum fosfat esaslı biyoseramik içeren malzemeler kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanım için potansiyel adaylar olsa da, bu seramikler genellikle düşük basma dayanımı ve kırılma tokluğu sergiler. Ayrıca, kalsiyum fosfatların düşük bozunma oranı düşük rezorpsiyon kinetiği ile ilişkilidir. Kalsiyum fosfat esaslı biyoseramiklerin sınırlamalarını aşmak için, bu malzemelere alternatif olarak kalsiyum silikat esaslı biyoseramik malzemeler kemik doku mühendisliği uygulamaları için araştırılmaktadır [114]. Kalsiyum silikatlar, kalsiyum (Ca) ve silisyum (Si) iyonlarını serbest bırakarak kemik rejenerasyonunu uyarır. Ca iyonları yeni oluşan kemiklerin ana bileşenidir. Si iyonları ise, kemik doku büyümesinde ve iskelet gelişiminde hayati bir rol oynar [30]. Ayrıca, Si iyonları kemik iliği mezenkimal stromal hücrelerinin farklılaşmasını ve osteoblastları teşvik ederek yeni kemik birikimini hızlandırır [114-116]. Kalsiyum silikatlar, Ca/Si oranlarına bağlı olarak monokalsiyum silikat (CaSiO_3), dikalsiyum silikat (Ca_2SiO_4) ve trikalsiyum silikat (Ca_3SiO_5) bileşikleri olarak sınıflandırılabilir. Bununla birlikte, kalsiyum silikatların kırılma yapıları ve zayıf mukavemetlerinin yanı sıra, yüksek çözünme hızı bu malzemelerin uzun vadeli kararlılıklarını etkileyen önemli dezavantajlarıdır [117,118]. Kalsiyum silikat sisteminin kristal yapısına eser elementlerin eklenmesi, bu malzemelerin sınırlamalarının üstesinden gelmek ve geliştirilmiş performansa sahip kalsiyum silikatlar elde etmek için iyi bilinen tekniklerden biridir [40][119]. Silikat esaslı biyoseramiklere eser elementlerin dahil edildiği en yaygın kullanılan kalsiyum silikatlar akermanit, bağdadit, bredigit, diyopsit, hardystonit, mervinit ve monticellit olarak sıralanabilir [120]. Magnezium (Mg), çinko (Zn) ve zirkonyum (Zr), kimyasal kararlılık, biyoaktivite ve mekanik özellikleri iyileştirmek veya kontrol etmek için kalsiyum silikat seramiklerine dahil edilen elementlerden bazılarıdır [121-123]. Memeli vücudu için önemli olan Ca ve Si ile birlikte Mg, hücre büyümesi ve proliferasyonunu uyararak iskelet metabolizmasını etkiler. Ayrıca Mg, iskelelerin kemik benzeri apatit oluşum kabiliyetinden sorumludur [124,125]. Diğer bir taraftan, çinko (Zn) ve zirkonyum (Zr) da Ca, Si ve Mg gibi insan vücudu için oldukça önemlidir [3,120]. Zn, kemik büyümesinde hayati bir rol oynar ve osteoblast proliferasyonu ve ALP aktivitesi üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Zr ise, biyoyumlu yapısı ve uygun mekanik özellikleri ile çok çeşitli biyoaktif sisteme dahil edilebilir. Si'ye benzer şekilde dört değerlikli bir iyon olan Zr, Ca iyonlarını iyonik olarak bağlayan bir ağ oluşturma potansiyeline sahiptir [126]. Zr'nin kalsiyum silikat fazına eklenmesi, kararlı yeni bir mineral fazının oluşumuna yol açmıştır. Zr içeren bir

kalsiyum silikat minerali olan bağdadit (BAG, $\text{Ca}_3\text{ZrSi}_2\text{O}_9$), mükemmel mekanik özellikleri, *in vitro* ve *in vivo* biyoaktivitesi, emilebilirliği, biyouyumluluğu ve HA'ya kıyasla artan hücre etkileşimi nedeniyle kemik ikame malzemesi olarak potansiyel uygulamalar için uygun bir malzeme olarak kabul edilmiştir [127]. Bağdadit biyoseramiklerinin mikro sertliği, kırılma tokluğu ve eğilme mukavemeti sırasıyla yaklaşık $7,9 \pm 0,2$ GPa, $1,3 \pm 0,1$ MPa $\text{m}^{1/2}$ ve 98 ± 16 MPa olarak bildirilmiştir [3]. Şekil 1.6'da BAG'ın kristal yapısı sunulmuştur.



Şekil 1.6 : BAG'ın kristal yapısı [38].

Ramaswamy ve çalışma ekibi [128], kemik doku mühendisliği için potansiyel kullanımını belirlemek amacıyla bağdaditin, osteoklast hücrelerinin (OC), insan osteoblast benzeri hücrelerin (HOb) ve endotel hücrelerin çoğalması ve farklılaşması üzerindeki *in vitro* etkilerini incelemiştir. Bu çalışmanın sonuçları, bağdadit seramiklerinin sistematize sitoskeleton yapısıyla HOb hücrelerinin bağlanmasını desteklediğini, gelişmiş hücre çoğalmasını ve farklılaşması gösterdiğini ortaya koymuştur. Osteoklastlar bağdadit üzerinde kültürlendiğinde osteoklast aktivitesi artmış ve bu da bağdaditin yeni kemik oluşumunu hızlandırırken kemik rejenerasyonunu uyarabileceğini göstermiştir. Ayrıca, bağdaditin endotel hücre bağlanmasını desteklediği de bu çalışmada raporlanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada, insan kemik osteosarkom hücreleri (Saos-2) ile yapılan MTT testinin *in vitro* hücre canlılığı sonuçları, bağdadit esaslı iskelelerin kültüre edilen kontrol grubuna göre sitotoksikiteye sahip olmadığı, iskelelerin yüzeyinde iyi hücre tutunması ve büyümesi gözlemlendiği raporlanmıştır [129]. Bağdadit esaslı iskelelerin MG63 osteoblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı diğer bir çalışmada iyi hücre tutunması ve yayılması ile bildirilmiştir [130]. Samani ve çalışma ekibinin yaptığı bir çalışmada [131] ise, PCL/grafen esaslı elektro-eğrilmiş nanokompozit iskelelere bağdadit eklenmesinin P19 embriyonal karsinom hücrelerinin iskelelere yapışmasını

desteklediği gösterilmiştir. Dahası, bağdaditin MG63 ve kemik iliği kök hücrelerinin canlılığı ve çoğalmasının iyileştiği *in vitro* testler yoluyla ortaya konmuştur [42,132]. Sadreddini ve çalışma ekibi [133] ise, sentezledikleri baryum katkılı bağdaditin poli(hidroksibutirat)ko(hidroksivalerat)-polikaprolakton (PHBV-PCL) iskeleleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Sonuçlar, bağdadit katkısının PHBV-PCL iskelelerinin mekanik dayanımı, biyoaktivite özellikleri ve Saos-2 hücrelerinin çoğalmasını arttırmasının yanı sıra, kontrol edilebilir bir bozunma hızı sağladığını göstermiştir. Bağdaditin *in vivo* performansı üzerine yapılan bir çalışmada, Roohani ve çalışma ekibi [134], geliştirdikleri bağdadit esaslı gözenekli doku iskelelerinin tavşan radyal kemik defektleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Radyografik görüntüleme sonuçları, bağdadit esaslı iskelelerin kalsiyum fosfat esaslı iskelelerle kıyaslandığında daha iyi kemik büyümesi gösterdiğini ortaya koymuştur. Histolojik analizler, kemiğin bu seramik iskelelerin gözenekleri içinde büyüdüğünü, kemiğin kemik ve iskele arasında büyüme eğiliminde olduğu göstermiştir. Ayrıca, kritik boyutlu kemik defektlerini onarma yeteneğine sahip olan bu iskelelerin kemik oluşumunu en üst düzeye çıkarmak için translasyonel uygulamalarda potansiyel kullanıma sahip olduğu bildirilmiştir. Luo ve çalışma ekibi [121], sıçanlarda femur defektlerinin suprakondiler bölgesine implantasyon yoluyla bağdadit esaslı seramik kürelerin *in vivo* osteogenezisini değerlendirmiştir. Sonuçlar, bağdadit esaslı kürelerin diyopsit ve β -TCP kürelerine göre defektlerde daha yüksek oranda yeni kemik oluşumunu teşvik ettiğini göstermiştir. Bağdadit esaslı iskelelerin büyük kemik defektlerinin tedavisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi için yapılan bir diğer çalışmada Li ve çalışma ekibi [135], koyun tibialarındaki kritik boyutlu segmental kemik defektlerine PCL/biyoaktif cam kaplamalı ve kaplamasız BAG iskelelerini implante ederek araştırmıştır. İmplantasyon sonrası, iskelelerin fizyolojik yükleri tolere etmekle birlikte, defekt bölgesinin etrafında dikkate değer bir köprüleme ve indüklenmiş yeni kemik oluşumunu gösterdiği ortaya konmuştur. Kemik implantlarının uzun vadeli performansını ve güvenilirliğini araştırmak için malzeme ve konak doku arasındaki *in vivo* etkileşimle ilgili bir araştırmada ise [136], kritik boyuttaki kemik defektlerini tedavi etmek için koyun tibialarına bağdadit esaslı iskelelerin implantasyonundan 26 hafta sonra implantın etrafında olumsuz kronik iltihaplanma veya lifli kapsül oluşumunun gözlemlenmediği bildirilmiştir.

Bununla birlikte, doğal kemik yapısında Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , F^- , Cl^- ve CO_3^{2-} gibi birçok iyonu barındırmaktadır. Kimyasal olarak, doğal kemiğin mineral kısmını içeren HA'nın bileşimi, kristal kafesteki Ca^{2+} , PO_4^{3-} veya OH^- iyonlarının diğer iyonlarla yer değiştirmesi sonucu stokiometrik olarak farklılaşır. Sentetik kalsiyum fosfat ve kalsiyum silikat esaslı malzemelerin yapısındaki bu iyonların eksikliği, biyolojik sistemlere kıyasla canlı sistemlerde daha düşük performansa yol açar. Bu nedenle, biyolojik apatitlere daha gerçekçi bir şekilde benzemek ve düşük mekanik mukavemet, zayıf biyolojik bozunma oranı gibi sınırlamaları aşmak ve sentetik malzemelerin biyoaktivite ve osteoindüksiyon özelliklerini iyileştirmek için bu malzemelerin yapılarına iyon veya element katkıları yapılmıştır [37,126,137-145]. Bor, pek çok biyolojik süreçte rol oynamasının yanı sıra, kemik oluşumu, büyümesi ve bakımı üzerindeki yararlı etkileriyle umut vaat eden metalik olmayan eser elementlerden biridir [48][49][50]. İskelelerde borat (BO_3^{3-}) veya metaborat (BO_3^-) iyonları olarak bulunan borun, kemik sağlığını ve büyümesini olumlu etkilediği bilinmektedir [50]. *In vitro* çalışmalar, matriste borun varlığının, osteoblast proliferasyonu ve farklılaşması üzerindeki etkilerini göstermiştir. Örneğin, Gorustovich ve çalışma ekibi [148], sıçan tibia kemik iliğine implante edilen bor katkılı 45S5 biyoaktif cam etrafındaki kemik dokunun histolojik, histomorfometrik ve mikrokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Histolojik ve histomorfometrik analizler, implantasyondan 15 gün sonra bor katkılı 45S5 biyoaktif cam etrafındaki kemik doku alanının, kontrol 45S5 camından önemli ölçüde daha yüksek olduğunu Ca:P oranında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendiğini ve bor katkılı camın kemik oluşumunu 45S5 camdan daha fazla artırdığını raporlanmıştır. Hakkı ve çalışma ekibi tarafından yapılan bir çalışmada, osteoblast öncülü MC3T3-E1 hücrelerinde kolajen tip I (COL I), kemik sialoproteini (BSP), osteokalsin (OCN) ve RunX2 gibi kemik oluşumu belirteçlerinin ekspresyonunun arttığını göstermiştir [51]. Moleküler düzey borun kemik metabolizmasında önemli bir role sahip olduğu ve rejeneratif tıpta yeni bir kullanım alanı bulabileceği de aynı çalışmada belirtilmiştir. Capati ve çalışma ekibi [146] ise, düşük bor konsantrasyonunun osteoblastik hücrelerin *in vitro* çoğalması ve farklılaşmasını hızlandırdığını raporlamıştır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde bor, çok çeşitli yöntemlerle biyoseramiklerin yapısına dahil edilmiştir. İlk olarak katı hal yöntemi kullanılarak kalsiyum fosfatların yapısına dahil edilen bor [149], Barheine ve çalışma ekibi tarafından yapılan bir

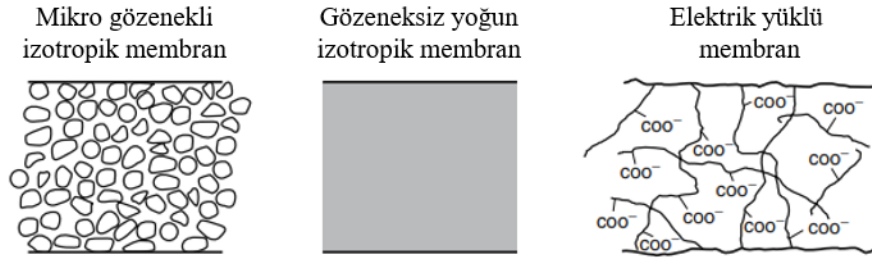
çalışmada bor kaynağı olarak borik asidin kalsiyum fosfatlara dahil edilmesiyle çalışılmıştır [150]. Kolmas ve çalışma ekibi, bor katkılı kalsiyum fosfat sentezi için hem geleneksel ıslak çöktürme hem de kuru yöntemi kullanmıştır [151]. Tunçay ve çalışma ekibi, yapay vücut sıvısı içerisinde mikrodalga destekli bor katkılı kalsiyum fosfat tozlarını ıslak çökeltme yöntemiyle sentezlemiştir [152]. Atilla ve çalışma ekibi tarafından yapılan bir çalışmada, bor katkılı biyoseramiklerin sentezi için sol-jel yöntemi kullanılmıştır [153]. Pazarçeviren ve çalışma ekibinin yaptığı bir çalışmada ise, bor katkılı kalsiyum fosfat seramikleri ıslak çökeltme/mikrodalga yöntemi ile hazırlanmıştır [154]. Yakın geçmişte Jodati ve çalışma ekibi, mikrodalga destekli ıslak çöktürme ve sol-jel yöntemiyle sentezledikleri bor katkılı kalsiyum fosfat/kalsiyum silikat esaslı biyoseramiklerin sentezini gerçekleştirmiştir [155].

1.1.3.2 Membran doku iskeleleri

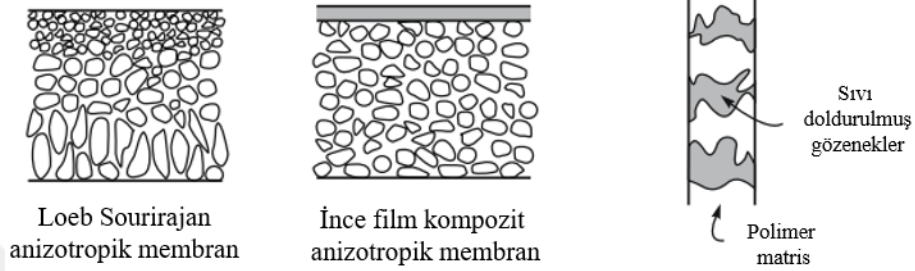
Membran, temel olarak iki faz arasındaki yarı geçirgen bariyer olarak tanımlanabilir [156]. Membranların büyük ölçekte ticari kullanımı yeni bir teknoloji olsa da, membran gelişiminin tarihi on sekizinci yüzyıla kadar uzanmaktadır [157]. İlk olarak laboratuvarlarda analitik bir araç olarak tanıtılan membranlar, daha sonra endüstriyel ürün ve yöntemlere dönüşmüştür [157]. Membran teknolojisinin hızla gelişmesiyle birlikte, membranlar su ve atık su arıtımı, enerji dönüşümü ve depolama, gaz ve buhar ayırma, gıda, biyoteknoloji ve sağlık gibi çok çeşitli endüstriyel uygulama alanında kullanılmaya başlanmıştır [158].

Membranlar morfolojilerine (simetrik ve anizotropik), kalınlıklarına, taşıma mekanizmalarına (aktif ve pasif), malzemelerine (organik ve inorganik) ve kökenlerine (biyolojik ve sentetik) göre sınıflandırılabilirler [159]. Şekil 1.7’de başlıca membran türleri şematik olarak gösterilmiştir. Bunlar arasında morfolojiye göre yapılan sınıflandırma büyük önem taşımaktadır. İzotropik (simetrik) membranlar düzgün bir bileşime ve yapıya sahip olup, gözenekli veya yoğun formda olabilir.

İzotropik Membranlar



Anizotropik Membranlar

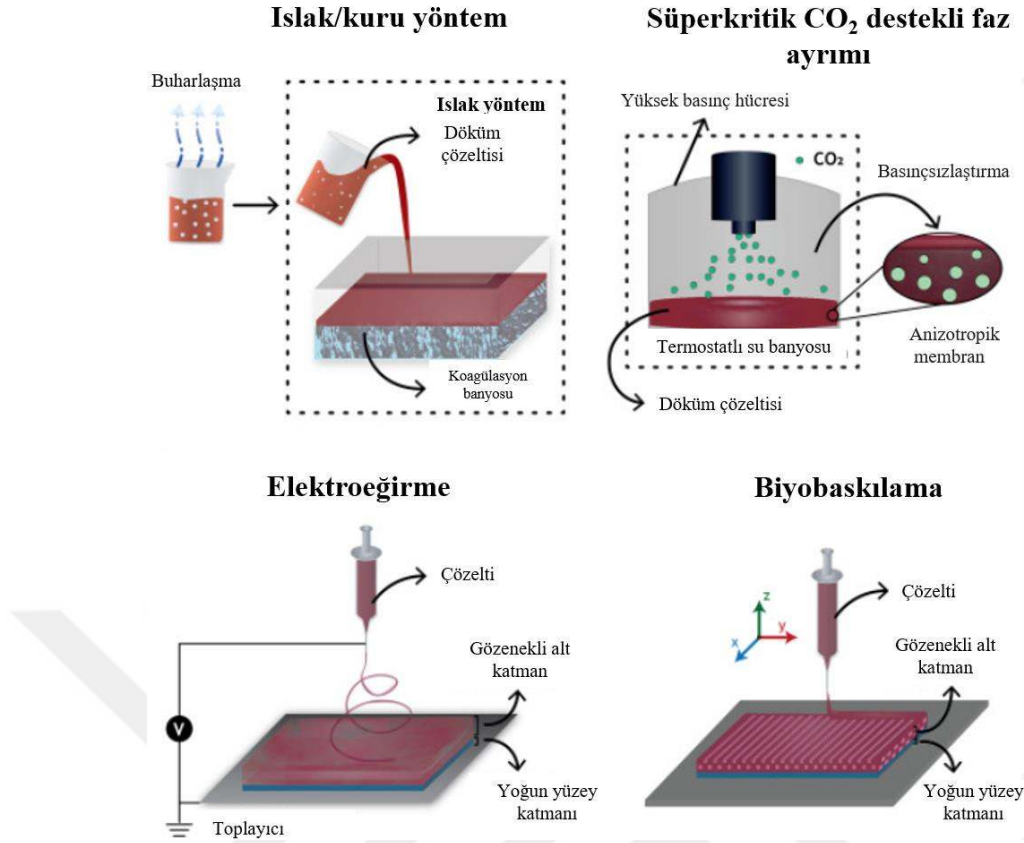


Şekil 1.7 : Başlıca membran türlerinin şematik gösterimi [156].

Anizotropik (asimetrik) membranlar ise, her biri farklı yapılar ve geçirgenliklere sahip katmanlardan oluşmaktadır. Tipik bir anizotropik membran, açık, çok daha kalın bir mikro gözenekli alt tabaka üzerinde desteklenen nispeten yoğun, ince bir yüzey katmanı ile karakterize edilir [156]. Bu katmanlı yapı, osteojenik etkiler yaratabilen insan kemik mezenkimal kök hücrelerinin üç boyutlu olarak çoğalması için elverişlidir [160]. Ayrıca, kemik doku mühendisliği uygulamaları için istenilen özelliklerde anizotropik membran formunun, membran doku iskelesi üretim prosesleri ve uygun malzeme seçimi ile kontrol edilebilmesi mümkündür.

1.1.3.3 Membran doku iskelelerinin üretim yöntemleri

Doku iskelesi üretimi, kemik doku mühendisliği uygulamalarında en önemli basamaklardan biridir. Membran formunda doku iskelelerin üretiminde kullanılan temel yöntemler elektroçirme, üç boyutlu baskılama, süperkritik karbondioksit destekli faz ayrımı ve ıslak-kuru yöntem/daldırma çökeltme olarak sıralanabilir [160]. Şekil 1.8’de membran üretiminde kullanılan temel yöntemler şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.8 : Membran üretiminde kullanılan temel yöntemlerin şematik gösterimi [160].

Elektroegirme yöntemi, doğal ECM'ye benzer lifli yapıların üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [160]. Bu yöntemde, enjektör tüpüne beslenen polimer çözelti yüksek voltajlı elektrik alana maruz bırakıldıktan sonra, ince bir jet halinde toplayıcıya yönlendirilerek nanofiber üretimi gerçekleştirilmektedir. Elektroegirme yönteminde polimerin molekül ağırlığı, çözeltinin iletkenliği, yüzey gerilimi, voltaj, akış hızı ve nozul ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe gibi çeşitli üretim parametrelerinin modüle edilmesiyle asimetrik membran doku iskelelerinin özellikleri kontrol edilebilmektedir [161,162]. Yatay elektroegirme, eş eksenli/çekirdek kabuk elektroegirme, emülsiyon elektroegirme, dönen toplayıcı elektroelektroegirme ve döner/santrifüj jet eğirme olarak sınıflandırılabilir [162].

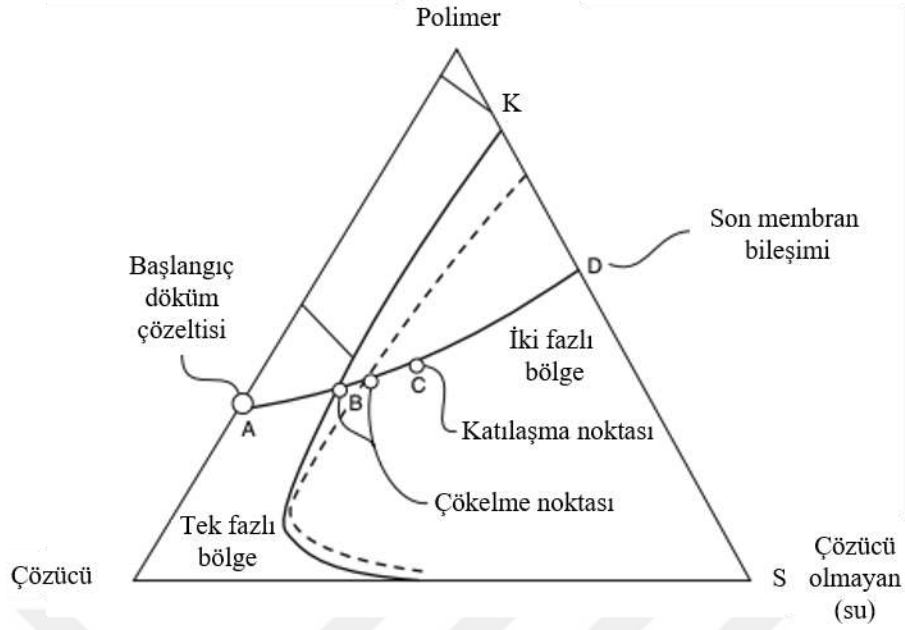
Diğer bir yöntem olan üç boyutlu biyobaskılama, karmaşık üç boyutlu geometrilere sahip yapıların hızlı bir şekilde üretimine olanak tanıyan bir eklemeli imalat teknolojisidir. Bu yöntemde, bilgisayar ile bir model tasarımı yapıldıktan sonra uygun bir malzemenin birbiri üzerinde enine kesitler halinde yazdırılması ile üç boyutlu yapının oluşumu gerçekleşir [77]. Üç boyutlu biyobaskılama yöntemi, doku iskelelerinin üretiminde esneklik ve tekrarlanabilirlik sağlamakla birlikte, farklı türde biyomalzeme ve hücre tiplerinin bir arada kullanımını mümkün kılar [163]. Asimetrik

membran doku iskelelerinin üç boyutlu baskılama yöntemi ile üretiminde, yapıya canlı hücreler dahil edilerek yoğun yüzey katmanı ve gözenekli alt katmanın üretimi gerçekleştirilebilir.

Bir diğer yöntem olan süperkritik karbondioksit destekli faz ayırma, basınçsızlaştırma oranı ve çözelti konsantrasyonu gibi üretim parametreleri modüle edilerek anizotropik membranların birçok özelliğinin kolay bir şekilde değiştirilmesine olanak sağlamaktadır [164].

Bu yöntemler arasında faz ayırma, anizotropik membran üretiminde kullanılan en yaygın yöntemdir. Faz ayırma yöntemi ile membran üretiminde, homojen bir polimer çözelti hazırlanır ve bir cam altlık üzerine film olarak dökülür. Dökülen film, çözücü olmayan bir banyoya daldırma, su buharı emilimi sağlamak için filmi nemli bir atmosfere yerleştirme ve çözücü buharlaştırma gibi çeşitli yollarla çökeltir. Çökeltme adımı sırasında bir faz homojen polimer çözelti iki faza ayrılır; polimer açısından zengin katı faz ve polimer açısından fakir sıvı faz. Polimer açısından zengin faz membran yapısını oluştururken, polimer açısından fakir faz membranın gözeneklerini oluşturur. Yüzeydeki çökeltme, filmin iç ve alt taraflarından daha hızlı gerçekleşir ve bu da membran yüzeyinde daha küçük bir gözenek oluşumuna neden olur. Membran yüzeyindeki bu anlık çökeltme, membranın iç tarafındaki çözücünün uzaklaştırılma hızını azaltarak büyük boşlukların oluşmasına neden olur. Böylece asimetric membran yapısı oluşur [156,159,165]. Faz ayırma yöntemi, termal olarak indüklenmiş faz ayrımı (TIPS) ve çözücü olmayan indüklenmiş faz ayrımı (NIPS) olarak ikiye ayrılır. TIPS sürecinde, yüksek bir sıcaklıkta hazırlanan polimer çözeltinin dökümü ve döküm filminin soğuması sonrası çökeltmenin mikro gözenekli bir yapı oluşturmak üzere meydana geldiği bir noktaya ulaşılır [156].

NIPS, en az üç bileşenli (polimer/çözücü/çözücü olmayan) ve çift taraflı kütle transferinden oluşan karmaşık bir sistemdir. Bu yöntemde polimer, bir çözücü ile sıvılaştırılır, dökülür ve çözücü olmayan bir çözelti içeren banyoya daldırılarak faz ayrımı gerçekleştirilir. Polimer, çözücü ve çözücü olmayan bileşenlerden oluşan bu sistemin faz ayrımı mekanizması üçlü faz diyagramı ile açıklanabilir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9 : Üç bileşenli bir sistemin şematik üçlü faz diyagramı [156].

Şekil 1.9'daki üçlü faz diyagramı incelendiğinde, üçgenin her bir köşesi bir polimer karışımının saf bileşenlerini temsil etmektedir. Tipik bir polimer çözeltisi, çözücü-polimer çizgisinde başlar ve çözücü olmayan madde sisteme dahil edildiğinde üçgenin içine doğru hareket eder. Kesiksiz çizgi olarak gösterilen eğri, diyagramı tek fazlı ve iki fazlı olmak üzere iki temel bölgeye ayıran binodal eğriyi temsil etmektedir. Tek fazlı bölgede tüm bileşenler karışabilirken, polimer çözeltisi iki fazlı bölgede polimer açısından zengin katı faz ve polimer açısından fakir sıvı faza ayrılır. Kesikli çizgi olarak gösterilen eğri ise, spinodal eğriyi ifade etmektedir. Binodal ve spinodal eğriler arasındaki bölge, polimer çözeltinin termodinamik olarak kararsız bir bölgede olsa bile normal olarak çökmediği yarı kararlı bölgedir. A noktasındaki belirli bir polimer konsantrasyonu için üçlü sistemin bileşimi, sürekli bir çözücü-çözücü olmayan değişimin meydana geldiği A-D yolunu izler ve D noktasında son membran bileşimine ulaşır. B noktasına kadar, bu çözelti bileşimi için çökme başlamaz. Ancak, bu noktadan sonra döküm çözeltisi metastabil bir bölgeye girer ve yol boyunca viskozitesi artar. C noktası, çökelen polimerin katı olarak kabul edilebileceği noktayı temsil etmektedir. Polimer-çözücü olmayan çizgisindeki K ve S noktaları ise, sırasıyla polimer açısından zengin katı fazı ve polimer açısından fakir sıvı fazı ifade etmektedir. D noktasının K-S çizgisi üzerindeki konumu, membranın gözenekliliğini göstermektedir. [156,159,165,166]. NIPS yoluyla membran oluşumu sırasında, döküm çözeltisine çözücü olmayan madde alımı döküm çözeltisinin bileşimini önce

kristalleşme bölgesine ve sonra binodal bölgeye getirir. Ancak, kristal çekirdeklerin oluşumu zaman aldığından, çözelti bileşiminin polimer kristalleşmesinin gerçekleşmesine izin verecek kadar uzun süre kristalleşme bölgesinde kalması gerekir. Çözelti bileşimi kristalleşme bölgesinde polimerin kristalleşmesine izin verecek kadar uzun süre kalırsa ve ardından binodal eğriyi geçerse, katı-sıvı ayrışması sıvı-sıvı ayrışmasından önce gerçekleşir. Bu durum, membran yapısının oluşumunu etkileyerek tipik olarak nodüler (küresel) bir yapı ile sonuçlanır. Diğer bir taraftan, çözelti bileşimi kristalleşme bölgesinde binodal eğriyi geçmeden önce yeterince uzun süre kalmazsa, sıvı-sıvı ayrışması polimer kristalleşmesinden önce gerçekleşir. Bu durum ise, tipik olarak yoğun bir yüzeye sahip anizotropik bir membran yapısı ile sonuçlanır [167]. Bu nedenle, NIPS sırasında çözücü olmayan maddenin kütle taşınımı, özellikle çözücü olmayan madde alım hızı, katı-sıvı ve sıvı-sıvı ayrışması arasındaki rekabette önemli bir etkiye sahip olup, üretilen membranların yapısı üzerinde kritik bir rol oynar [168]. Bu sistemde çözücünün dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmasından sonra, NIPS prosesinin koşulları uygun şekilde modüle edilerek istenen özelliklere sahip yapılar üretilabilmektedir. Döküm çözeltisinin bileşimi, çözücü ve çözücü olmayan maddeler, koagülasyon banyosu ortamı ve sıcaklığı gibi çeşitli parametreler membran özelliklerinin kontrol edilmesini sağlamaktadır [56].

2. BOR KATKILI BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT (BCP)/ POLİVİNİLİDEN FLORÜR (PVDF) ESASLI MEMBRAN İSKELELERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

2.1 Giriş

Şiddetli travma, kemik tümörlerinin rezeksiyonu, osteoporoz, konjenital eksiklik veya enfeksiyondan kaynaklanan kemik hasarları küresel bir sorun olmaya devam etmektedir [16,169,170]. Hasarlı kemiğin yapısını ve işlevini eski haline getirmek için kemiğe benzer özelliklere sahip yeni biyomalzemelerin geliştirilmesine yönelik artan bir ihtiyaç vardır [7].

Doğal kemik, ECM’de bulunan çeşitli makromoleküller aracılığıyla “piezoelektriklik” olarak bilinen elektriksel yüzey yükü üretebilmektedir [9,10]. Yüzey elektrik yükünün uyarılması, biyolojik hücre zarı boyunca iyon kanalının işlevini etkileyen ve zar potansiyelini izleyen kalsiyum iyonlarını aktive ederek, sinyalleşmede rol oynayan kalmodulin sinyal yolunu modüle etmektedir [10,16]. İskelelerdeki hücrelerin bu sinyallerle uyarılması, osteoblastik hücrelerin büyümesini, çoğalmasını, farklılaşmasını ve yapışmasını sağlayarak kemik rejenerasyonunun desteklenmesinde hayati bir rol oynamaktadır [10,11,169].

Son zamanlarda, harici bir güç kaynağına ihtiyaç duymadan hücre davranışını uyarıcı ve uzun süreli immünolojik yanıtlara yol açabilen piezoelektrik biyomalzemeler rejeneratif uygulamalar için kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır [91,169,171-173]. Piezoelektrik biyomalzemelerden biri olan poliviniliden florür (PVDF), ferro, piro ve piezoelektrik özelliklerinden oluşan üstün elektroaktivitesi, yüksek biyouyumluluğu, termal stabilitesi ve işleme kolaylığı nedeniyle geniş bir potansiyel uygulama yelpazesi için ilgi kazanmıştır [10-13]. Ayrıca, PVDF esaslı iskeleler doğal ECM'nin yapısını ve elektriksel tepkisini taklit ettikleri, yeni kemik oluşumu ve osteojenik hücre farklılaşmasını teşvik ettikleri için klinik öneme sahiptir. [15-18]. Yarı kristalli bir polimer olan PVDF, beş farklı kristalin faza sahiptir. Bu fazlar, β -fazı için all-trans (TTT) düzlemsel zikzak, α - ve δ -fazları için transgauche-trans-gauche (TGTG') ve γ -

ve ϵ -fazları için trans ve gauche (T3GT3G) gibi farklı zincir konformasyonlarıyla ilişkilidir [10,12,16,86]. Bunlar arasında PVDF'in β -fazi, birim hücre başına en yüksek dipolar moment (8 $\times 10^{-30}$ Cm) nedeniyle diğer kristal fazlarla karşılaştırıldığında en yüksek piezoelektrikliği sergilemektedir [12,13,86]. Son zamanlarda β -PVDF'nin piezoelektrik özelliğinin hücre davranışı üzerindeki etkisi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. M.T.Rodrigues ve çalışma ekibi [89], keçi iliği hücrelerinin (GMC) büyümesi ve osteoblastlara farklılaşması için β -PVDF membranlarını karakterize etmiştir. β -PVDF'nin piezoelektrik özelliğinin GMC'lerin yapışmasını ve çoğalmasını sağlamasının yanı sıra, bunların osteojenik fenotipe doğru farklılaşmasını arttırdığı raporlanmıştır. Ribeiro ve çalışma ekibi [90], elektroaktif β -PVDF filmlerin substrat polarizasyonunun, insan adipoz kök hücrelerinin daha yüksek osteojenik farklılaşması için gerekli elektromekanik uyarıları sağlayabileceğini ve böylece farklı kemik rejenerasyon stratejilerini geliştirebileceğini raporlamıştır.

Hasarlı kemiğin yenilenmesinde biyoaktif seramiklerin polimer matrise dahil edilmesi, iskelelerin mekanik ve biyolojik özelliklerinin modüle edilmesi için etkili bir stratejidir [30-32]. Hidroksiapatit (HA, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) ve betatrikalsiyum fosfat (β -TCP, Ca₃(PO₄)₂) gibi kalsiyum fosfatlar, güçlü biyoaktiviteleri, biyouyumlulukları ve doğal kemiğin mineral bileşenlerine kimyasal benzerlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılan biyoseramiklerdir [11,33,34]. HA ve β -TCP'nin özelliklerinin birleştirilmesiyle elde edilen bifazik kalsiyum fosfat (BCP) seramikleri, kemik rejenerasyonunda saf HA ve β -TCP'ye göre daha yeteneklidir [35,36]. Ayrıca, gözenekliliği kontrol edilerek farklı mekanik konfigürasyonlar elde edilecek şekilde uyarlanabilen BCP, çeşitli malzemelerle katkılanarak çok işlevli hale getirilebilmektedir. Doğal kemik dokusundaki CaP ise, yapısında Na⁺, K⁺, Mg²⁺, F⁻, Cl⁻ ve CO₃²⁻ gibi birçok iyonu barındırmaktadır. Sentetik CaP'lara iyon katkılanması, doğal kemiğin gerçekçi bir şekilde taklit edilmesine ve kemik hasarlarının tedavisinde istenilen özelliklere sahip malzemelerin üretilmesine katkıda bulunan bir yaklaşımdır [37]. Bor (B), pek çok biyolojik süreçte rol oynamasının yanı sıra, kemik oluşumu, büyümesi ve bakımı üzerindeki yararlı etkileriyle umut vaat eden metalik olmayan eser elementlerden biridir [48-50]. *In vitro* çalışmalar, matriste borun bulunmasının, osteoblast proliferasyonu ve farklılaşması üzerindeki etkilerini göstermiştir [37,51-53,146]. Ayrıca bor, moleküller arasında çapraz bağlantılar oluşturarak kristal yapıyı güçlendirmektedir [54].

Membran doku iskelelerinin üretiminde, çözücü döküm-parçacık liçi, hızlı prototipleme (RP) [174], elektrospınleme [175] ve daldırma çökeltme [14,55] dahil olmak üzere çok çeşitli teknikler kullanılmıştır. Bu teknikler arasında "çözücü olmayan faz ayrımı (NIPS)" olarak adlandırılan daldırma çökeltme, çeşitli membran yapılarının kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir üretimine olanak tanıyan en yaygın uygulanan yöntemdir [176].

Çalışmanın bu bölümünde, farklı oranlarda bor katkılı BCP tozları sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Daha sonra, sentezlenen tozlar PVDF çözeltisine dahil edilerek NIPS tekniğiyle membran formunda kompozit iskeleler üretilmiştir. Sentezlenen tozların üretilen iskelelerin özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İskelelerin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri, Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. İskelelerin fiziksel özellikleri yüzey temas açısı ve şişme ölçümleri ile değerlendirilirken, mekanik özellikleri çekme dayanımı ölçümleri ile belirlenmiştir. Üretilen iskelelerin termal özellikleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile belirlenirken, β -kristalizasyon oranı FTIR ile hesaplanmış ve β -faz yapısı X-ışını kırınımı (XRD) ile karakterize edilmiştir. İskelelerin biyoaktiviteleri, simüle edilmiş vücut sıvısında (SBF) değerlendirilmiş ve iskelelerin sitotoksitesisi *in vitro* hücre kültürü deneyleri yapılarak araştırılmıştır.

2.2 Deneysel Çalışmalar

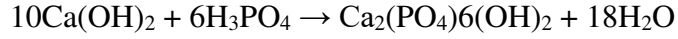
2.2.1 Malzemeler

BCP tozlarının sentezi için başlangıç malzemeleri olarak kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ve fosforik asit (H_3PO_4), katkılı BCP tozlarının sentezi için ise bor kaynağı olarak borik asit (H_3BO_3) MerckTM (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Membran doku iskelesi üretiminde kullanılan PVDF ve PVDF'in çözücüsü olan *N,N*-dimetilformamid (DMF, $(\text{CH}_3)_2\text{NC}(\text{O})\text{H}$) sırasıyla Solvay (Solef® 1015) ve Fisher firmasından temin edilmiştir. Üretilen membran doku iskelelerinin *in vitro* biyoaktivite çalışmalarında kullanılmak üzere sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), magnezyum klorür heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) MerckTM (Almanya) firmasından ve sodyum bikarbonat (NaHCO_3) Sigma-AldrichTM (Almanya) firmasından satın alınmıştır. İskelelerin *in vitro* şişme çalışmalarında

kullanılan fosfat tampon çözeltisi (DPBS, pH 7.4), Gibco™ (ABD) firmasından temin edilmiştir.

2.2.2 Bor katkılı BCP tozlarının sentezi

BCP tozları, kalsiyum ve fosfor kaynağı olarak sırasıyla Ca(OH)₂ ve H₃PO₄ kullanılarak, ıslak kimyasal yöntem ile aşağıdaki reaksiyona göre sentezlenmiştir [49].



Öncelikle, 0,3375 M Ca(OH)₂ 120 mL saf su içerisinde bir manyetik karıştırıcıda (Stuart™ UC152D) 40 °C'de 30 dk boyunca karıştırılmıştır. Sürekli karıştırılan Ca(OH)₂ çözeltisine 1,67'lik stokiometrik Ca/P oranı verecek şekilde 0,5 g/dk hızla 0.245 M H₃PO₄ yavaş yavaş ilave edilmiştir. H₃PO₄ ilavesinden sonra, çözelti 40 °C'de 48 saat boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti 3000 rpm'de 4 dakika boyunca bir santrifüj cihazında (Hettich™ Universal 320/320R) santrifüj edilmiştir. Daha sonra kalan sıvı dekante edilmiş ve yeniden süspansiyon elde etmek için 120 mL saf su ilave edilmiştir. Bu adım 5 kez tekrarlandıktan sonra elde edilen çökeltiler bir etüvde (Ecocell™) 110 °C sıcaklıkta 48 saat boyunca kurutulmuştur.

Bor katkılı BCP tozlarının sentezi ise, yukarıda açıklananlara benzer adımlarla gerçekleştirilmiştir. Çözeltiye Ca(OH)₂ eklenmeden önce bor kaynağı olarak H₃BO₃ ağı. %0.5, 1 ve 2 olacak şekilde 120 mL saf su içerisinde çözölmüştür. Islak kimyasal yöntemin ardından kurutulan saf ve bor katkılı tozlar, kamara tipi bir laboratuvar fırınında (Protherm™ PLF 160/7) 1200 °C'de hava atmosferinde 2 saat süreyle ısıtma işleme tabi tutulmuştur. Deneylerde seçilen ısıtma/soğutma hızı 5 °C/dk'dır. Sentezlenen tozlar, akık havan ve havan tokmağı kullanılarak öğütölmüş ve membran doku iskelelerinin üretimi için hazır hale getirilmiştir. Bor katkısı içeriğine bağılı olarak sentezlenen tozlar sırasıyla BCP, BCP/0.5B, BCP/1B ve BCP/2B olarak adlandırılmıştır.

2.2.3 Bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin üretimi

Çalışmanın ilk bölümünde, sentezlenen tozlar PVDF'e katkılanarak beş farklı membran doku iskelesi NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleri ile üretilmiştir. Kompozit çözeltilerin her biri, toplam katı madde konsantrasyonu ağı. %18'de sabit tutularak 10'ar mL olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle, PVDF'in DMF içerisinde bir manyetik karıştırıcıda 60 °C'de 24 saat boyunca karıştırılmasıyla homojen bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözelti içerisine sentezlenen BCP tozları, PVDF'in ağırlık %10'u oranında eklenmiştir. Hazırlanan çözelti, homojen bir karışım elde etmek amacıyla dökümden önce 10 dk boyunca sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, bir cam altlık üzerine 200 mikronluk film olarak dökülmüş ve ardından hacimce %60:40 oranında DMF ve su içeren koagülasyon banyosuna 5 °C'de 3 saat süreyle daldırılmıştır. Elde edilen membranlar, kalan çözücünün uzaklaştırılması için 48 saat boyunca saf su banyosunda durulanmış ve -80 °C'de 4 saat boyunca bir liyofilizatörde (Toros™ TRS-2/2V) liyofilize edilmiştir. Polimer matristeki toz içeriğine bağlı olarak iskeleler sırasıyla PVDF, P/BCP, P/BCP/0.5B, P/BCP/1B ve P/BCP/2B olarak adlandırılmıştır. Hazırlanan kompozit membran doku iskelelerinin kimyasal kompozisyonları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : Üretilen farklı oranlarda bor katkılı BCP/PVDF esaslı kompozit membran doku iskelelerinin döküm çözeltisi bileşimleri.

Numune Kodu	Çözelti bileşimleri	
	PVDF (%ağırlık)	Bor katkılı BCP (%ağırlık)
PVDF	18	0
P/BCP	16,2	1,8
P/BCP/0.5B	16,2	1,8
P/BCP/1B	16,2	1,8
P/BCP/2B	16,2	1,8

2.2.4 Karakterizasyon

2.2.4.1 Bor katkılı BCP tozlarının karakterizasyonu

Sentezlenen tozların morfolojik karakterizasyonu, bir alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM, FEI QUANTA FEG 250) kullanılarak 10 kV hızlanma voltajında gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme öncesi numunelerin yüzeyi altın-paladyum tabakası ile kaplanarak iletkenlik kazanması sağlanmıştır.

Sentezlenen tozların partikül boyut ölçümleri, bir partikül boyutu analizörü (Malvern™ Mastersizer 3000E) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Partikül boyut ölçümlerinde dağıtıcı ortam olarak saf su kullanılmıştır. Tozların yoğunlukları, bir gaz piknometresi (Micromeritics™, AccuPyc II 1340) kullanılarak ölçülmüştür.

Sentezlenen tozların kristal fazlarının varlığı, X-ışınları difraktometresi (XRD, XPERT PANALYTICAL) kullanılarak monokromatik Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) radyasyonu ile 40 kV potansiyel fark, 40 mA akım ve $2\theta = 10^\circ\text{--}60^\circ$ tarama aralığı koşullarında tespit edilmiştir. Mevcut kristalin fazlar, Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi (The International Centre for Diffraction Data®; ICDD) toz kırınım veri tabanı kullanılarak tanımlanmıştır.

2.2.4.2 Bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin karakterizasyonu

Farklı bor katkı oranlarına sahip BCP/PVDF esaslı membran iskelelerin yüzey ve kesit morfolojileri, enerji dağılımlı spektroskopi (EDS) ile entegre bir FE-SEM (FEI QUANTA FEG 250) kullanılarak 2 ila 5 kV arasında değişen hızlanma voltajında görüntülenmiştir. Numuneler önce sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve kesit görüntüleri elde etmek için kırılmıştır. Görüntüleme öncesi numunelerin yüzeyi altın-paladyum tabakası ile kaplanmıştır. İskelelerin gözenek boyut ölçümleri, SEM görüntüleri kullanılarak Image J 1.520 yazılımı ile en az yüz gözenekten ortalama gözenek boyutu olarak hesaplanmıştır.

İskelelerin kristal faz yapısı, Bragg-Brentano gonyometresi ve Lynxeye XE detektörü ile entegre bir X-ışınları difraktometresi (XRD, Bruker™ AXS-Discovery D8) kullanılarak monokromatik Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) radyasyonu ile 40 kV potansiyel fark, 40 mA akım ve $2\theta = 10^\circ\text{--}35^\circ$ tarama aralığı koşullarında tespit edilmiştir. Mevcut kristalin fazlar, Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi veri tabanı kullanılarak tanımlanmıştır.

İskelelerin yüzey temas açısı ölçümleri, bir temas açısı analizörü (Biolin Scientific™/Attension Theta Flex) ile sabit damla yaklaşımıyla saf su ve PBS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümden önce iskelelerden eşit boyutlarda kesilen numuneler çift taraflı yapışkan bant kullanılarak bir cam altlık üzerinde düzleştirilmiştir. 5 μL hacimli damlalar numunelerin yüzeyine pipetlenerek her bir damla bırakıldıktan hemen sonra görüntüleri yakalanmıştır. 5 saniyelik temas sonrasında alınan damlacık görüntülerinde damlacığın temas açısındaki değişiklikler gözlenmiştir. Çalışmalar üç paralel numune ile yürütülmüş ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

İskelelerin su emme kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla şişme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Öncelikle iskeleler eşit boyutlarda kesilerek kuru ağırlıkları bir hassas terazide (Shimadzu™ - AUX321; $\pm 0,0001$ g duyarlılık) tartılmış ve W_d olarak kaydedilmiştir. Daha sonra, kesilen numuneler kapaklı cam şişelerde 30 mL PBS içerisinde (pH 7,4) 37 °C sabit sıcaklıkta 1, 7, 14, 21 ve 28 gün boyunca inkübe edilmiştir. Belirlenen periyotların sonunda numunelerin yüzeylerindeki sıvı hafifçe uzaklaştırılmış, tartılarak W_w olarak kaydedilmiştir. Çalışmalar üç paralel numune ile yürütülmüş ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. İskelelerin şişme değerleri Denklem 2.1'e göre hesaplanmış ve $(W_s)t$ olarak kaydedilmiştir:

$$(W_s)t = \frac{W_w - W_d}{W_d} \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte W_d iskelelerin kuru ağırlığını, W_w iskelelerin yaş ağırlığını ve $(W_s)t$ iskelelerin t zamanındaki şişmiş ağırlığını ifade etmektedir.

İskelelerinin mekanik performansı, bir statik mekanik test cihazı (Shimadzu™ AGS-X) kullanılarak ölçülmüştür. Eşit boyutlarda kesilen numunelerin üzerine 1 kN'luk yük hücresi ile 50 mm/dk'lık sabit hızla kuvvet uygulanmış ve doku iskelelerinin gerilim-gerinim (stress/strain) eğrileri elde edilmiştir. Test sonucunda elde edilen eğrilerin doğrusal bölgesindeki eğim alınarak elastik modül değerleri hesaplanmıştır. Çalışmalar beş paralel numune ile yürütülmüş ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

İskelelerin termal özellikleri, bir diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC, TA Instrument/DSC25) cihazı kullanılarak incelenmiştir. Analizler -90 °C ila 200 °C sıcaklık aralığında ısıtma, 200 °C ila -90 °C sıcaklık aralığında soğutma ve 10 °C/dk ısıtma hızı ile azot ortamında yürütülmüştür. Erime ve kristalleşme sıcaklıkları sırasıyla ısıtma ve soğutma eğrilerinin tepe noktalarından belirlenmiştir. Erime entalpisi, ilk ısıtma eğrisinin 120 ila 170 °C arasındaki sıcaklıklardan entegre edilerek hesaplanmıştır. Numunelerin toplam kristallliği ise Denklem 2.2'ye göre hesaplanmış ve X_C olarak kaydedilmiştir:

$$X_C = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \times 100 \quad (2.2)$$

burada ΔH_f numunenin erime sırasındaki füzyon ısısı, ΔH_f^0 ise 104.5 J·g⁻¹ olduğu varsayılan %100 kristalin PVDF polimerinin füzyon ısısıdır.

PVDF esaslı iskelelerin içerisindeki bağıl β fazı içeriği, bir Fourier dönüşümü kızılötesi (ATR-FTIR, Thermo Nicolet iS50) spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. FTIR spektrumları 400 ila 4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında, 14 cm^{-1} çözünürlükte ve 16 tarama ile kaydedilmiştir. 763 cm^{-1} (α fazı) ve 838 cm^{-1} (β fazı)'deki absorpsiyon bantlarının bağıl yoğunluğundan bağıl β fazı içeriği Denklem 2.3'e göre hesaplanmış ve F_β olarak kaydedilmiştir:

$$F_\beta = \frac{A_\beta^{838}}{1.26A_\alpha^{763} + A_\beta^{838}} \quad (2.3)$$

Bu eşitlikte, A_α^{763} ve A_β^{838} numunelerin sırasıyla 763 cm^{-1} ve 838 cm^{-1} 'deki absorbans yoğunluklarıdır. 1,26 değeri ise, α -fazının ($7,7 \times 10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) ve β -fazının ($6,1 \times 10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) absorbans katsayılarının oranına karşılık gelmektedir [29][177].

Üretilen iskelelerin *in vitro* biyoaktivite çalışmaları, yapay vücut sıvısı (10xSBF) içerisinde gerçekleştirilmiştir [178]. Çalışma kapsamında toplam hacmi 1 L olarak hazırlanan 10xSBF stok çözeltisinde kullanılan reaktifler ve konsantrasyonları Çizelge 2.2'de listelenmiştir. İnsan kan plazmasındaki kalsiyum ve fosfat iyonlarının on katını içeren 10xSBF'nin tercih edilmesinin nedeni, kalsiyum fosfat çekirdeklenmesini hızlandırmaktır.

Çizelge 2.2 : 10xSBF stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan reaktiflerin konsantrasyonları.

Bileşenler	Ekleme sırası	İyonik konsantrasyon (mM)
NaCl	1	1000,00
KCl	2	5,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	3	25,00
MgCl ₂ .6H ₂ O	4	5,00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5	3,62
NaHCO ₃ *	6	10,00

*100 mL SBF için.

10xSBF hazırlama işleminde, Çizelge 2.2'de listelenen ilk beş reaktif, her adımda reaktifin tamamen çözünmesine dikkat edilerek sırasıyla 900 mL ultra saf su içerisinde çözülmüştür. Hacmin ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmasıyla stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden 100 mL kapaklı cam şişe içerisine alınarak konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde NaHCO₃ ilave edilmiş ve bir pH metre (Seven Compact Duo S214, Mettler™ Toledo) ile pH değerinin 7,4 olması sağlanmıştır.

Hazırlanan 10xSBF çözeltisi hemen kullanılabileceği gibi, 4 °C’de 1 ay boyunca muhafaza edilebilir. Biyoaktivite çalışmaları, üretilen beş farklı iskeleden eşit boyutlarda kesilen numunelerin hazırlanan 10xSBF çözeltisi içerisinde 3 ve 14 gün boyunca ıslatılması ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından, yavaşça çözelti içerisinden çıkartılan numuneler saf su ile hafifçe yıkanmış ve -20 °C’de dondurulduktan sonra -80 °C’de liyofilizatörde 4 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Numunelerin yüzey morfolojileri FE-SEM kullanılarak 10 kV hızlanma voltajında görüntülenmiş ve oluşan mineralize tabakanın kimyasal bileşimi yarı kantitatif EDS ile karakterize edilmiştir. Numunelerin yüzeyindeki apatit oluşumu, XRD kullanılarak Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) radyasyonu ile 40 kV potansiyel fark, 40 mA akım ve $2\theta=10^\circ - 50^\circ$ tarama aralığı koşullarında incelenmiştir. Numunelerin kimyasal yapıları ve yapıda bulunan OH⁻, CO₃⁻² ve PO₄⁻³ fonksiyonel grupların varlıkları 400 – 4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında alınan ATR-FTIR spektrumları ile gösterilmiştir.

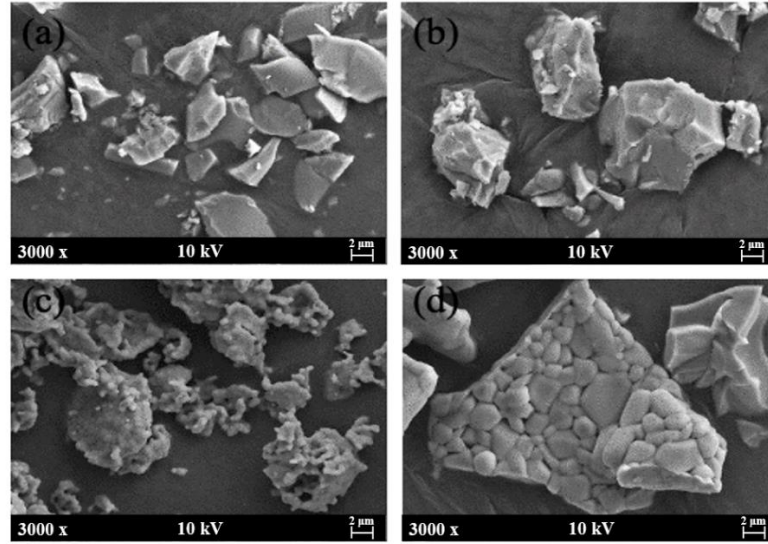
İskelelerin hücre canlılığı ve sitotoksitesi, bir RTCA sistemi (ACEA Biosciences xCELLigence) kullanılarak ISO-10993-5 test protokolüne göre ölçülmüştür. L929 fare fibroblast hücrelerinin optimum ekim konsantrasyonu belirlenmiş ve ardından hücreler (15x10³ hücre/kuyu) 24 saat boyunca bir E-Plakaya 16’ya (ACEA Biosciences) ekilmiştir. Muamele edilmemiş L929 hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre empedansı, E-Plaka 16’nın altına yerleştirilen etkileşimli mikroeletrot sensörleri kullanılarak 120 saat boyunca her 30 dakikada bir hücre canlılığını belirlemek için RTCA sistemi tarafından ölçülmüştür. RTCA, elektriksel empedansı ölçerek hücre canlılığını, hücre sayısını, bağlanma kalitesini ve hücre tipini ifade eden bir parametre olan hücre indeksini görüntülemektedir.

Tüm kantitatif veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak rapor edilmiştir. İskelelerin şişme oranı, gözeneklilik ve çekme dayanımı verilerinin istatistiksel analizlerini gerçekleştirmek için Microsoft Excel ve Origin yazılımı (Origin Lab) kullanılmıştır. Hücre canlılığı ve sitotoksite deneylerinin istatistiksel analizleri bir yönlü ANOVA ile gerçekleştirilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar P değeri <0,05 olacak şekilde uygulanmıştır.

2.3 Bulgular ve Tartışma

2.3.1 Bor katkılı BCP tozlarının karakterizasyonu

Islak kimyasal yöntem ve ardından 1200 °C’de sentezlenen bor katkılı BCP tozlarının SEM görüntüleri, Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

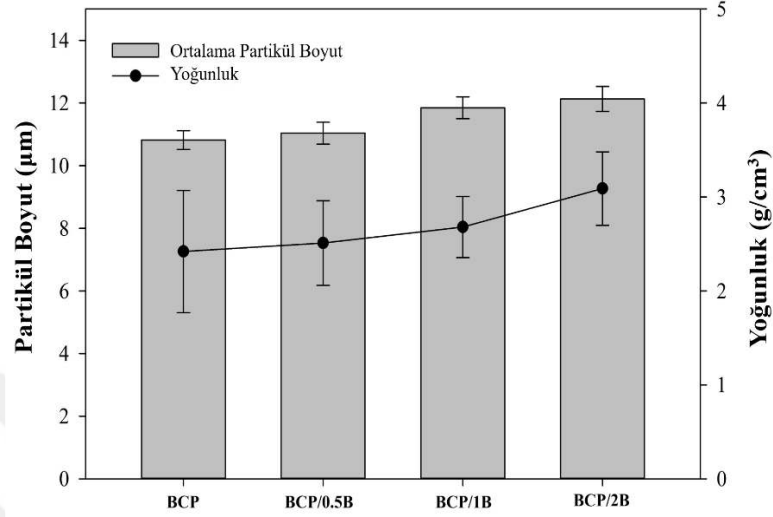


Şekil 2.1 : Islak kimyasal yöntem ve ısıtım işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen BCP tozlarının SEM görüntüleri ağı. (a) %0, (b) %0.5 (c) %1 ve (d) %2 bor katkılı BCP.

Sentezlenen tozların bor içeriğinin tozların morfolojisi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde, BCP tozlarının kümelendiği ve düzensiz bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. SEM analizine ek olarak seçilen ağı. %0 ve %2 bor katkılı BCP tozlarının çeşitli noktalarında EDS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, sentezlenen BCP tozlarının esas olarak kalsiyum (Ca) ve fosfordan (P) oluştuğunu ve tozlarda başka hiçbir safsızlık bulunmadığını göstermiştir. EDS analizi Ca/P oranının sırasıyla 1,29 ve 1,34 olduğunu göstermiş olup, bu oranın doğal kemiğin 1,67 olan Ca/P oranına yakın olduğu söylenebilir [49]. SEM ile morfolojisi belirlenen farklı geometrik şekillerde tozlara sahip aglomeralar, çok sayıda düzensiz partikülün varlığına kanıt oluşturmaktadır.

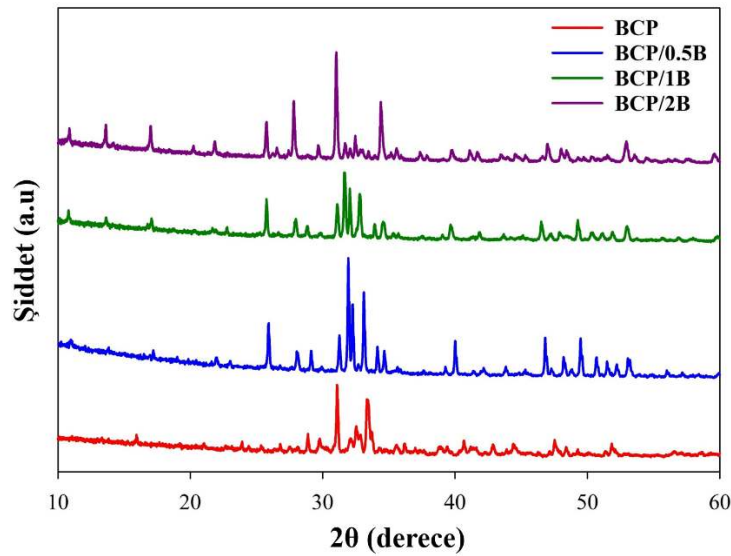
Kümelenen mikropartiküllerin boyutunun belirlenmesi amacıyla tozlara partikül boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda, SEM görüntülerinde gözlenen çeşitli boyutlardaki BCP mikropartiküllerinin ortalama partikül boyutlarının 15 µm’nin altında olduğu belirlenmiştir. Şekil 2.2, ağı. % 0, 0.5, 1 ve 2 bor katkılı BCP tozlarının partikül boyut dağılım grafiğini göstermektedir. Şekil 2.2 incelendiğinde, tozların

partikül boyut dağılımının 10,82 ila 12,13 μm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Değişen bor içeriği ile tozların partikül boyut ve morfolojisinde belirgin bir değişiklik olmamıştır. Albayrak [49]'ın bulgularına benzer şekilde ağ. %2 bor katkısıyla BCP tozlarının partikül boyutunda önemli bir artış olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 2.2 : Islak kimyasal yöntem ve 1200 °C'de ısıtıl işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen tozlara ait ortalama partikül boyut ve yoğunluk değerleri.

Ağ. %0, 0.5, 1 ve 2 bor katkılı BCP tozlarının piknometre yoğunlukları Şekil 2.2'de göstermektedir. Ağ. %2 bor eklenmesi, BCP tozlarının yoğunluğunu 2,42 g/cm^3 'ten 3,09 g/cm^3 'e arttırmıştır.



Şekil 2.3 : Islak kimyasal yöntem ve 1200 °C sıcaklıkta ısıtıl işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen BCP tozlarının XRD difraktogramı.

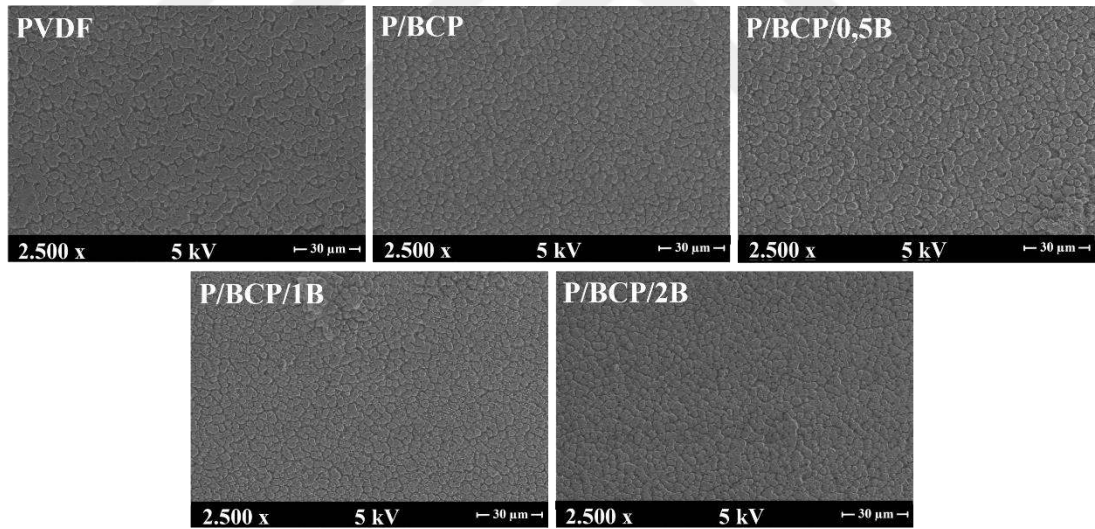
Islak kimyasal yöntem ve ardından 1200 °C sıcaklıkta ısıtıl işlem ikili yöntemleri ile sentezlenen tozların kristalin fazlarını belirlemek ve saflığını kontrol etmek için XRD

analizi gerçekleştirilmiştir. BCP ve ağırlık %0.5, 1 ve 2 bor katkılı BCP tozlarının XRD difraktogramları Şekil 2.3'te gösterilmiştir. XRD analizinde, $2\theta = 25.9^\circ, 31.8^\circ, 32.2^\circ, 33^\circ, 34.1^\circ, 46.8^\circ$ ve 49.6° noktalarında gözlenen pikler JCPDS 01-073-4869 numaralı referans karta göre HA ve β -TCP'den oluşan BCP'nin varlığını doğrulamıştır. Artan bor takviyesinin miktarına bağlı olarak piklerin tepe noktalarda kaymaların olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni, B^{+} 'nin iyonik yarıçapının Ca^{2+} 'nin iyonik yarıçapından önemli ölçüde daha büyük olmasıdır. Bu kayma, B^{+} iyonlarının BCP'nin örgü yapısında yerleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte, bor katkılı BCP yapısında tespit edilen β -TCP'nin ağırlık yüzdesinin bor içeriği değiştirilerek değiştirilebileceği ortaya konmuştur.

2.3.2 Bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin karakterizasyonu

2.3.2.1 Morfolojik ve fizikokimyasal özellikler

NIPS yöntemiyle üretilen membran doku iskelelerinin yüzey ve kesit SEM görüntüleri Şekil 2.4 ve Şekil 2.5'te gösterilmektedir.

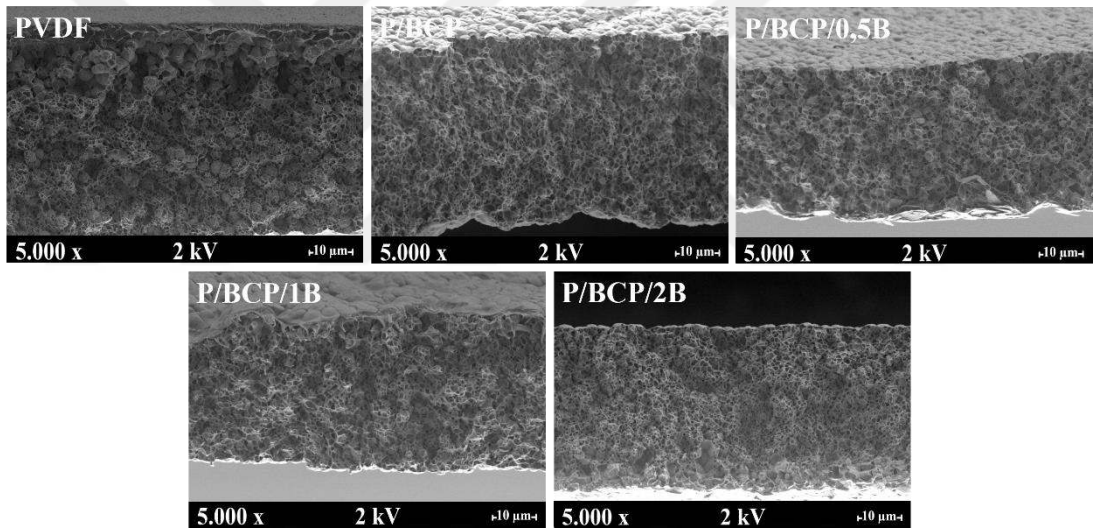


Şekil 2.4 : NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen membran doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri.

Yüzey SEM görüntüleri, bu yöntemle hazırlanan polimerik membranların tipik özelliği olan yoğun yüzey katmanını ortaya koymaktadır. Bu yoğun katman, hızlı çözücü akışı nedeniyle polimer kristalizasyonunun gerçekleştiği koagülasyon banyosunda oluşur [55]. Bununla birlikte, PVDF esaslı iskelelerin yüzey morfolojisinin, polimer matrise toz eklenmesiyle önemli ölçüde değişmediği

görülmüştür. Diğer bir değişle, tüm iskelelerin yüzey SEM görüntülerinde homojen dağılımlı düzgün bir yüzey morfolojisi gözlenmiştir.

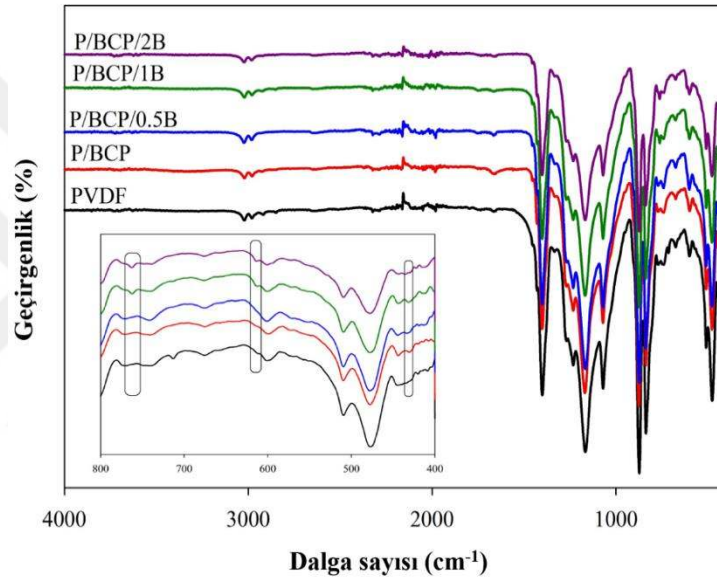
Kesit SEM görüntüleri, iskelelerin yoğun yüzey katmanının altında birbirine bağlı mikro gözenekleri göstermektedir. Bu yoğun katman ve mikro gözenekler, tek fazlı homojen bir çözeltinin NIPS yönteminde çökeltme aşaması sırasında matrisi oluşturan polimer açısından zengin bir faz ve iskelelerin gözeneklerini oluşturan polimer açısından fakir bir faz olmak üzere iki faza ayrılmasıyla oluşturulur. Çökelmenin yüzeyde iç ve alt kısımlara göre daha hızlı gerçekleşmesi, daha küçük gözenek oluşumuna ve daha yoğun bir yapıya neden olurken, iç kısımda çözücü giderim oranının azalması daha büyük gözeneklerin oluşmasına neden olur [156]. Ayrıca, NIPS işlemi sonrasında uygulanan liyofilizasyon tekniği sonucunda iskelelerin tamamı toz içeriğine bağlı olarak farklı gözenek boyutlarına sahip bal peteği benzeri düzenli gözeneklerden oluşmuştur.



Şekil 2.5 : NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen membran doku iskelelerinin kesit SEM görüntüleri.

Kemik rejenerasyonunda gözenek boyutu, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini etkinleştiren hücre çoğalması, farklılaşması ve göçünde önemli bir rol oynar [179]. Yapılan çalışmalarda MG63 insan osteoblast hücrelerinin 0,2 – 1 µm gözenek boyutuna sahip polikarbonat esaslı polimerik yüzeylere tamamen yapışıp yayıldığı ve 3,0 – 8,0 µm gözenek boyutunun besleyici hücrelerin göçüne izin verdiği belirtilmiştir. Ayrıca, 5,0 – 8,0 µm'lik bir gözenek boyutunun, polimerik membranlar üzerinde büyüyen embriyonik kök hücrelerin osteojenik farklılaşması için yeterli olduğu bildirilmiştir [179]. Çalışmanın bu bölümünde üretilen beş farklı membran iskele, $2,57 \pm 1,74$ ila $9,19 \pm 3,3$ µm arasında değişen birbirine bağlı kesitsel gözenekle karakterize

edilmiştir. İskelelerin ortalama gözenek boyutu, PVDF numunesi için $2,57 \pm 1,74 \mu\text{m}$ iken, P/BCP numunesinde $9,19 \pm 3,3 \mu\text{m}$ 'ye yükselmiştir. Bor katkılı BCP toz içeriğinin polimer matristeki oranının artması, sırasıyla P/BCP/0,5B, P/BCP/1B ve P/BCP/2B numuneleri için gözenek boyutunun $4,96 \pm 2,18 \mu\text{m}$, $6,62 \pm 2,25 \mu\text{m}$ ve $3,4 \pm 1,09 \mu\text{m}$ 'ye düşmesine neden olmuştur. Polimer matrisine eklenen tüm tozların katkısız PVDF iskelesine kıyasla gözenek boyutunu arttırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Abzan ve çalışma ekibi [55] tarafından yapılan bir çalışmada, NIPS ve termal olarak indüklenen faz değişimi yöntemlerinin kombinasyonu ile hazırlanan PVDF esaslı membran iskeleler için değişen proses parametreleriyle $0,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ 'den $4,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$ 'ye kadar artan bir gözenek boyutuna sahip olduğu raporlanmıştır.



Şekil 2.6 : Membran doku iskelelerinin FTIR spektrumları.

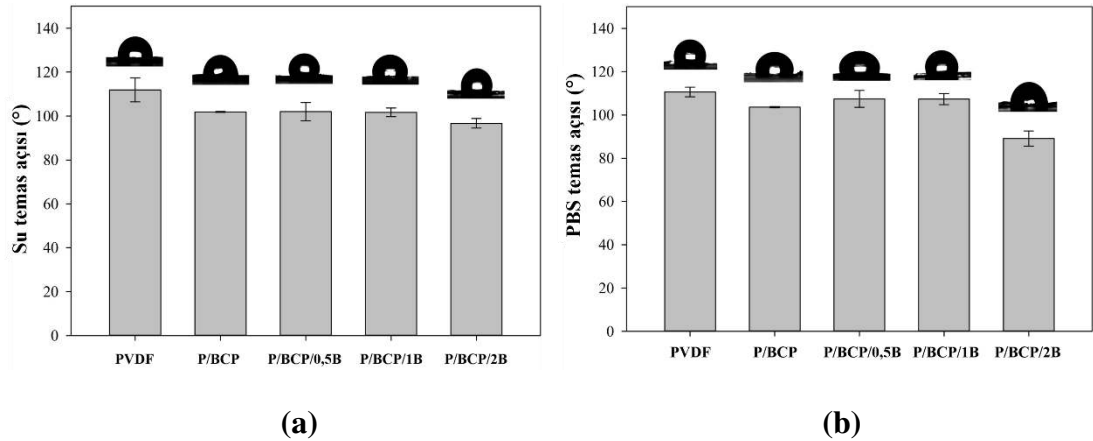
Şekil 2.6, PVDF, BCP ve B'nin karakteristik bantlarını gösteren numunelerin FTIR spektrumlarını göstermektedir. Şekil 2.6 incelendiğinde, CH_2 gruplarının titreşimine atfedilen 1400 cm^{-1} 'de yer alan karakteristik bantlar ve 795 cm^{-1} 'de bir omuz sergilediği görülmektedir [180,181]. 1068 cm^{-1} , 1166 cm^{-1} ve 1232 cm^{-1} 'deki pikler, CF_2 gruplarının gerilme titreşimlerini temsil ederken, 766 cm^{-1} 'deki pik CF_2 gruplarının bükülme titreşim moduyla ilişkilendirilmiştir. CH_2 ve CF_2 gruplarının asimetrik gerilme titreşim modundan kaynaklanan absorpsiyon bandı, 840 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 840 cm^{-1} 'deki bu pik, CH_2 ve CF_2 gruplarının asimetrik gerilme titreşim moduyla ilişkilendirilmiştir [181].

Bor ve BCP'nin PVDF matrisine dahil edilmesiyle yeni pik noktaları ortaya çıkarmasına rağmen, PVDF'in karakteristik pikleri tüm spektrumlarda görülmüştür.

474 cm^{-1} , 604 cm^{-1} , 962 cm^{-1} , 1047 cm^{-1} ve 1092 cm^{-1} 'de yer alan pikler BCP'yi oluşturan fazlardan biri olan HA'ya atfedilirken, 947 cm^{-1} , 983 cm^{-1} ve 1122 cm^{-1} 'deki pikler ikincil β -TCP fazını göstermektedir. Fosfat iyonlarındaki P-O iyonik bağının simetrik gerilmesinin titreşim modu 947 cm^{-1} , 962 cm^{-1} ve 983 cm^{-1} 'de gözlenirken, asimetrik gerilme modu 1047 cm^{-1} , 1092 cm^{-1} ve 1122 cm^{-1} olarak indekslenmiştir [182]. BO_3^{3-} grubunun simetrik bükülme titreşim moduna ilişkin bant 783 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 638 cm^{-1} 'de yer alan pikin, OH^- grubunun serbest moduna ait olduğu bilinmektedir [49]. PVDF numunesine ilişkin spektrumun, bor katkılı BCP'nin varlığını doğrulayan söz konusu bölgelerdeki pikler nedeniyle katkılı numunelerin spektrumlarından farklı olduğu Şekil 2.6'da açıkça görülmektedir. PVDF matrisinin yapısal simetrilerindeki şiddetli değişikliklerin, bor ve BCP tozlarının matrise dahil edilmesiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Numunelerin FTIR spektrumları, PVDF yapısına bor ve BCP katkılarının etkisi için kanıt olarak kullanılabilir. PVDF matrisinde toz katkılarının neden olduğu değişiklikleri daha iyi görselleştirmek için, değişiklikleri içeren spektrumlar şeklin içerisine yerleştirilmiştir.

2.3.2.2 Fiziksel ve mekanik özellikler

PVDF esaslı membran iskelelerinin karşılaştırmalı yüzey ıslanabilirliği, su ve PBS olmak üzere iki farklı ortam kullanılarak temas açısı ölçümleriyle değerlendirilmiş ve ölçüm sonuçları Şekil 2.7 (a) ve (b)'de verilmiştir.



Şekil 2.7 : Membran iskelelerin temas açısı değerleri: (a) su temas açısı, (b) PBS temas açısı.

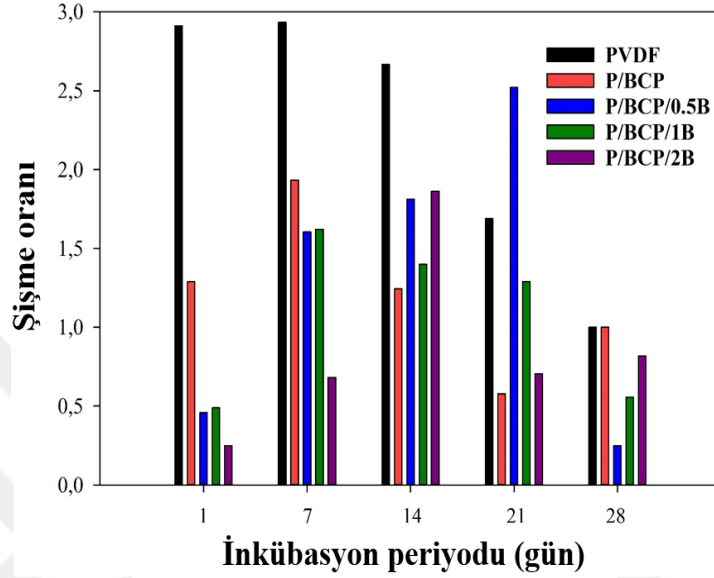
Elde edilen sonuçlara göre, PVDF esaslı iskelenin su temas açısı değeri $111,92^\circ \pm 10,1^\circ$ olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, PVDF'in doğal hidrofobik özelliğini ortaya koymaktadır [183]. Diğer bir taraftan, BCP katkılı PVDF esaslı iskelenin su temas

açısı değeri $101,85^{\circ} \pm 0,44^{\circ}$ 'ye düşerek ıslanabilirlikte bir artış göstermiştir. Ek olarak, sırasıyla ağ. %0.5, %1 ve %2 bor katkılı BCP/ PVDF esaslı iskeleler için su temas açısı değerleri $102,01^{\circ} \pm 8,3^{\circ}$, $101,68^{\circ} \pm 3,98^{\circ}$ ve $96,68^{\circ} \pm 4,35^{\circ}$ olarak ölçülmüştür. PVDF esaslı iskelenin su temas açısı değerinin, tozların polimer matrise dahil edilmesiyle azaldığı söylenebilir. Bu sonuç, önceki araştırmalarla tutarlı olarak hidrofilisiteyi arttırmak için kullanılan katkı maddelerinin etkisini ortaya koymaktadır [183].

Üretilen iskelelerin yüzey ıslanabilirliğinin daha fazla araştırılması amacıyla PBS ile temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, PVDF'in $111,92^{\circ} \pm 10,10^{\circ}$ olarak kaydedilen su temas açısı değeri, PBS içerisinde gerçekleştirilen temas açısı ölçümlerinde $110,62^{\circ} \pm 4,41^{\circ}$ olarak ölçülmüştür. Öte yandan, ağ. %2 bor katkılı iskele için su temas açısı değeri $96,68 \pm 4,35^{\circ}$ iken, PBS temas açısı değerinin $89,13^{\circ} \pm 6,95^{\circ}$ 'ye düştüğü görülmektedir. Szewczyk ve çalışma ekibi [18] tarafından yapılan benzer bir çalışmada, farklı voltaj polariteleri uygulanarak elde edilen elektroegrilmiş PVDF doku iskelelerinin su, PBS, DMEM (Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle medium) ve hücre kültürü olmak üzere farklı ortamlarda temas açısı değerleri ölçülmüştür. PVDF(+) durumu için ölçülen su temas açısı değeri $144,5^{\circ} \pm 5,0^{\circ}$ iken, PBS temas açısı değeri $141,8^{\circ} \pm 4,5^{\circ}$ olarak kaydedilmiştir. Numuneye ait su temas açısı değerinin, PBS ve diğer ortamlardaki temas açısı ölçüm sonuçlarına göre daha yüksek olduğu raporlanmıştır.

Yüzey ıslanabilirliği ile yakından ilişkili olan iskelelerin fizyolojik ortamda şişme yeteneği, biyolojik etkileşimdeki anahtar faktörlerden biridir. Yeterli bir şişme derecesi, hücre kültürü ortamının emilimini ve besin akışını kolaylaştırarak kemik büyümesini desteklemektedir [51]. İskelelerin şişme deneyleri, numunelerin PBS (37°C , $\text{pH}=7.4$) içerisine 28 gün boyunca daldırılmasıyla gerçekleştirilmiş ve elde edilen şişme değerleri Şekil 2.8'de verilmiştir. Şekil 2.8 incelendiğinde, 24 saatlik inkübasyon sonrası PVDF esaslı iskelenin şişme derecesi 2,91 iken, BCP katkılı PVDF esaslı iskenin şişme derecesi 1,28 olarak ölçülmüştür. İskelelerdeki BCP içeriğinin artmasıyla birlikte, BCP tozlarının hidrofobik doğasına atfedilen azalan bir şişme davranışı sergilenmiştir [52]. Farklı bor konsantrasyonlarına sahip BCP'nin PVDF esaslı iskelelere katkılanmasıyla bu azalma eğiliminin devam ettiği gözlemlenmiştir. Ağ. %2 bor katkılı BCP/PVDF esaslı iskelenin 24 saatteki şişme derecesi, 0,25'e kadar azalmıştır. Bunun nedeninin önceki çalışmalarımızla tutarlı

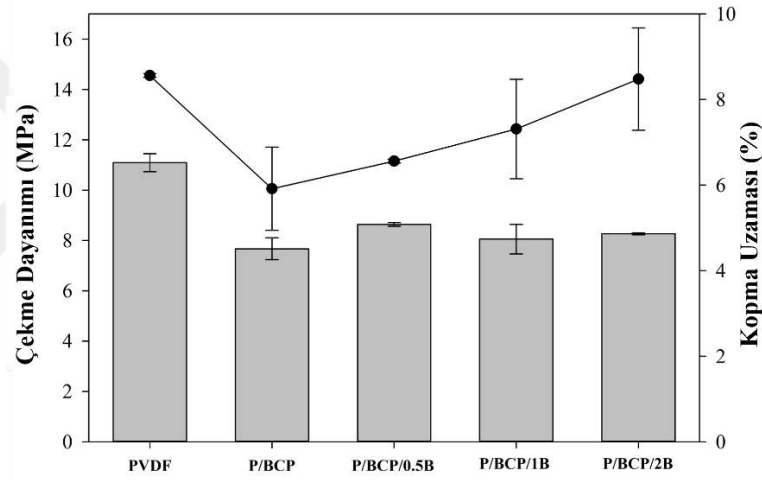
olarak artan toz içeriği nedeniyle iskelelerin genel gözenekliliğinin azalması olduğu söylenebilir [30,31]. Diğer bir taraftan, tüm iskelelerin 24 saat içerisinde neredeyse doygunluğa ulaşarak 7. günde maksimum şişme kapasitesine ulaştığı gözlenmiştir. İskelelerin şişme eğilimi, 14. günden sonra azalmaya başlamış olup, bunun nedeni şişmenin daha yüksek aşamasında polimer zincirlerinin kırılması olabilir.



Şekil 2.8 : Membran iskelelerin şişme değerleri.

Hidrofilisite ve şişme kabiliyeti, vücuda implante edilen iskelelerin mekanik bütünlüğünü önemli ölçüde etkilemektedir. İskelelerin mekanik davranışı, implantasyondan sonra yüksek *in vivo* mekanik yüklere dayanma etkinliklerinin en önemli belirleyicilerinden biridir [183]. İskeleler, kabul edilebilir bir mikro ortam sağlamak için kemiğin doğal ECM'sini mekanik olarak taklit etmelidir. Farklı oranlarda bor katkılı BCP içeren PVDF esaslı membran iskelelerin çekme dayanımı-kopma uzaması eğrisi Şekil 2.9'da gösterilmektedir. PVDF esaslı numunenin çekme dayanımı ve kopma uzaması değerleri sırasıyla $11,09 \pm 0,71$ MPa ve $\%8,56 \pm 0,08$ iken, BCP eklenmesi ile sırasıyla $7,66 \pm 0,87$ MPa ve $\%5,91 \pm 1,94$ olarak kaydedilmiştir. Ağ. %0.5 bor eklenmesi, P/BCP numunesinin çekme dayanımı ve kopma uzamasını sırasıyla $8,63 \pm 0,14$ MPa ve $\%6,56 \pm 0,08$ 'e kadar arttırmıştır. Daha düşük bor içeriğine (ağ. %0.5) sahip numunenin mekanik dayanımındaki artış, bunun tozların polimer matris içinde daha iyi dağılmasından kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, polimer matrise daha fazla borun dahil edilmesi, P/BCP/0.5B'ye kıyasla iskelelerin gerilme dayanımında bir azalmaya neden olmuştur. Bu azalma, daha fazla bor içeriğine sahip PVDF esaslı iskelelerin daha büyük gözenek

boyutuna bağılı olabilir. İskelelerdeki daha büyük gözeneklerin varlığı, önceki araştırmalarda bildirildiği gibi mekanik özellikleri azaltmıştır [12]. Öte yandan, önceki araştırmalarda raporlandığı gibi kristalleşme davranışı membran iskelelerinin mekanik özelliklerini etkileyebilir [181]. Bölüm 2.3.2.3'te tartışılan kristalleşme davranışlarıyla ilgili olarak, en yüksek toplam kristalliliğe sahip PVDF numunesinin çekme dayanımı ve kopma uzamasının diğer numunelerle karşılaştırıldığında en yüksek olduğu görülebilmektedir. Bununla birlikte, P/BCP numunesindeki β -faz içeriğinin artmasıyla birlikte mekanik özellikler azalmış olup, bu durum numunenin toplam kristalliliğinin azalmasıyla açıklanabilir. PVDF esaslı numunelerin toplam kristalliliğindeki toz dağılımı, gözenek yapısı, toplam kristallik oranları ve β -faz içeriği ile birleştirildiğinde, bu faktörlerin iskelelerin mekanik dayanımını güçlü bir şekilde etkilediğini söylemek mümkündür.

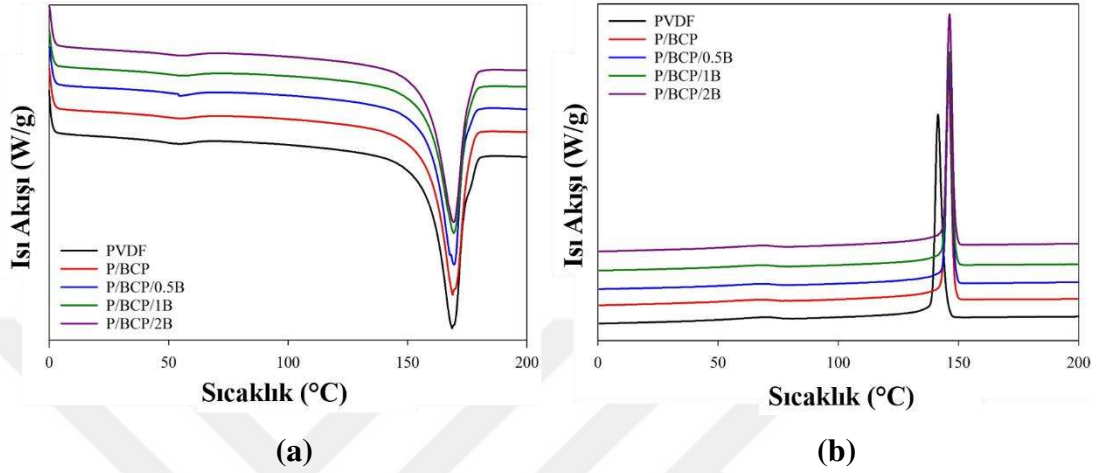


Şekil 2.9 : Membran iskelelerin çekme dayanımı - % uzama değerleri.

2.3.2.3 Termal özellikler ve β faz içeriği

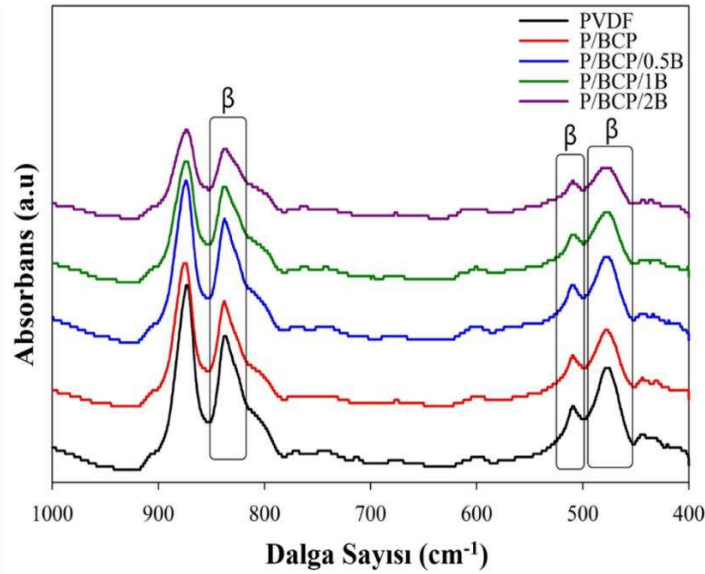
Üretilen membran iskelelerin termal davranışı DSC kullanılarak belirlenmiş ve ilgili ısıtma ve soğutma eğrileri sırasıyla Şekil 2.10 (a) ve (b)'de gösterilmiştir. İskelelerin erime, kristalleşme sıcaklıkları ve kristalleşme davranışları Çizelge 2.3'te özetlenmiştir. PVDF, P/BCP ve P/BCP/0.5B numunelerine ait spektrumlarında, sırasıyla α ve β fazlarının erime davranışına atfedilen 168 °C ve 170 °C'de iki endotermik pikin mevcut olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, P/BCP/1B ve P/BCP/2B numunelerinde ise sadece β fazına ait endotermik pikin varlığı tespit edilmiştir [184,185]. BCP ilavesinin ve BCP'ye bor katkısının PVDF'nin β -kristal oluşumunu arttırıcı etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Şekil 2.10 (b)'de görüldüğü gibi katkıların ilavesiyle PVDF

numunesinin kristalizasyon sıcaklığında 5 °C'lık bir kayma meydana gelmiştir. Yapılan bir çalışmada [14], PVDF membran yapısına grafen oksit eklenmesinin, heterojen çekirdeklenmeye neden olduğu ve membranın kristalleşme sıcaklığını arttırdığı raporlanmıştır. Benzer şekilde bu çalışmada kullanılan katkılar membranın çekirdeklenme davranışını değiştirmiş ve kristalleşme sıcaklığını 5 °C artırmıştır.



Şekil 2.10 : Membran iskelelerin DSC termogramları: a) birinci ısıtma döngüsü, b) kristalizasyon.

Membran iskelelerinin FTIR spektrumları ve Lambert-Beer yasasına (Denklem 2.3) göre hesaplanan β kristalizasyon oranları sırasıyla Şekil 2.11 ve Çizelge 2.3'te gösterilmiştir. 530, 613, 763, 796, 853, 870 ve 975 cm^{-1} 'deki pikler PVDF'nin α fazıyla ilişkilidir [175,186].



Şekil 2.11 : Membran iskelelerin FTIR spektrumları.

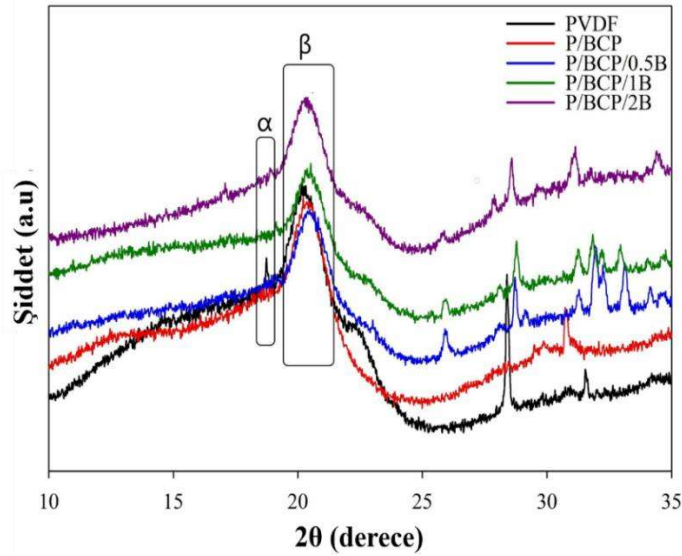
530, 613, 763, 796, 853 ve 975 cm^{-1} 'deki α -fazının karakteristik bantları hazırlanan tüm iskelelerinin spektrumlarında kaybolmuştur. Diğer bir taraftan, iskelelerin spektrumlarında 473, 511, 838 cm^{-1} 'de PVDF'nin β fazıyla ilişkili yeni piklerin olduğu görülmüştür [175,186].

Çizelge 2.3 incelendiğinde, membran iskele üretim prosesinin β fazının oluşumunu desteklediği ve iskelelerin β faz içeriğini %30,20'den (PVDF tozunun % β faz içeriği) %70'e çıkardığı görülmektedir. Şekil 2.11'de görülebileceği gibi, BCP yapısındaki bor konsantrasyonunun artmasıyla β fazına ilişkin piklerin yoğunluğu azalmıştır. Bu sonucun Lambert-Beer yasalarına göre hesaplanan ve Çizelge 2.3'te verilen % β -faz oranlarıyla da doğrulandığı söylenebilir.

Çizelge 2.3 : Farklı oranlarda bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin % kristallinite oranı ve β faz fraksiyonu.

Numune Kodu	$T_{m\alpha}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{m\beta}$ ($^{\circ}\text{C}$)	Kristalizasyon Sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)	Kristalinite (X_c) (%)	β faz oranı (F_{β}) (%)
PVDF	168,64	169,76	141,68	66,54	79,69
P/BCP	168,88	170,24	146,12	62,71	80,40
P/BCP/0.5B	167,52	169,64	146,28	56,58	79,53
P/BCP/1B	N.D.	169,58	146,12	57,37	76,10
P/BCP/2B	N.D.	169,60	146,40	60,09	73,72

PVDF esaslı iskelelerin XRD ile belirlenen α ve β faz yapıları Şekil 2.12'de gösterilmiştir.



Şekil 2.12 : Membran iskelelerin XRD difraktogramları.

Şekil 2.12 incelendiğinde $2\theta = 18,5^{\circ}$ ve $20,3^{\circ}$ 'de görülen piklerin sırasıyla PVDF'in α ve β fazlarına karşılık geldiği tespit edilmiştir [175,183]. α -fazının karakteristik piki,

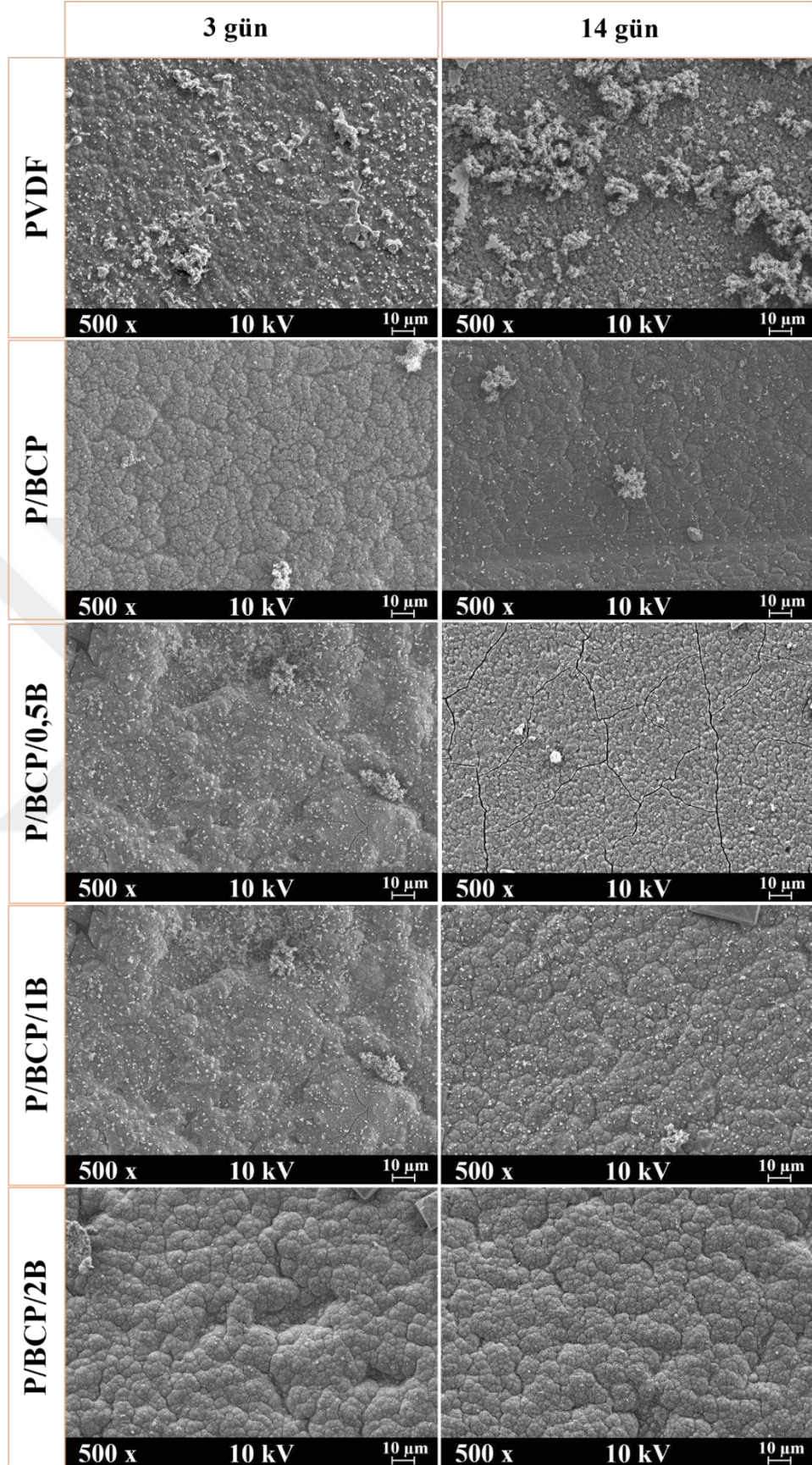
BCP'nin ve bor katkılı BCP ilaveli iskelelerinin tüm difraktogramlarında ortadan kaybolurken, β -fazına ait pik açıkça görülmektedir.

Çizelge 2.3'te iskele yapısına bor katkılı BCP ilave edilmesiyle β kristalleşme oranının azaldığı görülse de, XRD ve DSC sonuçlarında iskelelerde α faz piklerine rastlanmamış olup, yalnızca β fazına ait pikler görülmüştür. Ancak, Çizelge 2.3'te verilen iskelelerin % β kristalleşme değerleri toplam kristalizasyon ile oranlandığında, toplam kristalleşmede en yüksek β - kristalizasyonun değerini P/BCP/0.5B numunesinde, en düşük β -kristalizasyon değerinin ise saf PVDF numunesinde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, elde edilen sonuçların membran iskelelerinin sırasıyla Bölüm 2.3.2.2 ve 2.3.2.4'te tartışılan mekanik ve biyolojik test sonuçlarıyla da tutarlı olduğu söylenebilir.

2.3.2.4 *In vitro* biyolojik özellikler

In vitro deneylerde yüzey kalsiyum fosfat (CaP) tabakasının oluşumu, biyoaktivitenin bir göstergesidir. Biyoaktivite, yeni kemik doku oluşturma ve CaP tabakası aracılığıyla çevre dokuya bağlanma yeteneğidir [187]. CaP katmanı, apatit ile aşırı doyurulmuş yarı kararlı bir CaP çözeltisi olan yapay vücut sıvısı (SBF)'den apatitin heterojen çekirdeklenmesiyle oluşturulur [188].

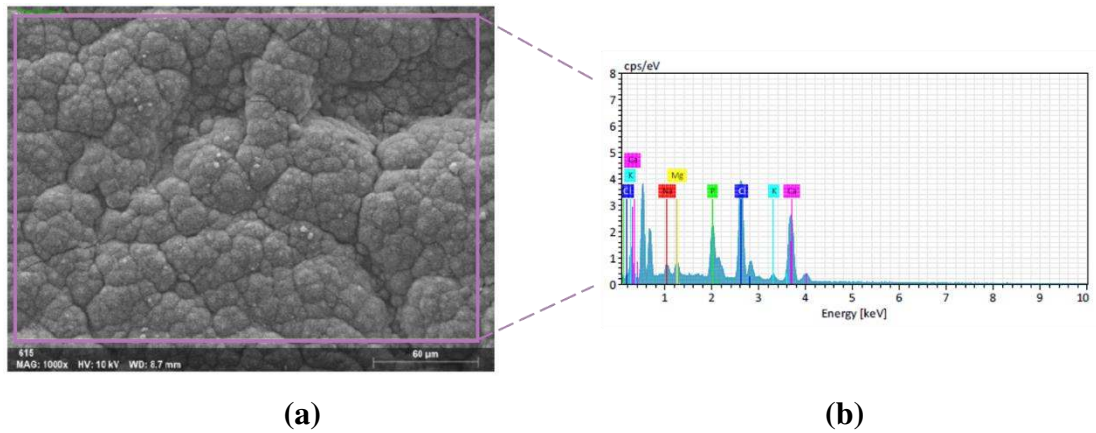
Çalışma kapsamında *in vitro* biyoaktivite deneyleri, CaP katmanının oluşumunu hızlandırmak için on kat daha yüksek konsantrasyonda Ca ve P iyonu içeren 10xSBF çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir [30-32]. İlk 24 saatlik süre içerisinde görsel olarak incelenen iskelelerin yüzeyinde CaP tabakası oluşumuna dair herhangi bir iz gözlenmemiştir. Şekil 2.13, 10xSBF'de 37 °C'de 3 ve 14 günlük inkübasyondan sonra membran iskelelerin SEM görüntülerini göstermektedir. 3 günlük inkübasyonun ardından iskelelerin yüzeylerinde kemik benzeri apatit çekirdek oluşumunun başladığı Şekil 2.13'te görülmektedir.



Şekil 2.13 : Membran iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyonun ardından SEM görüntüleri.

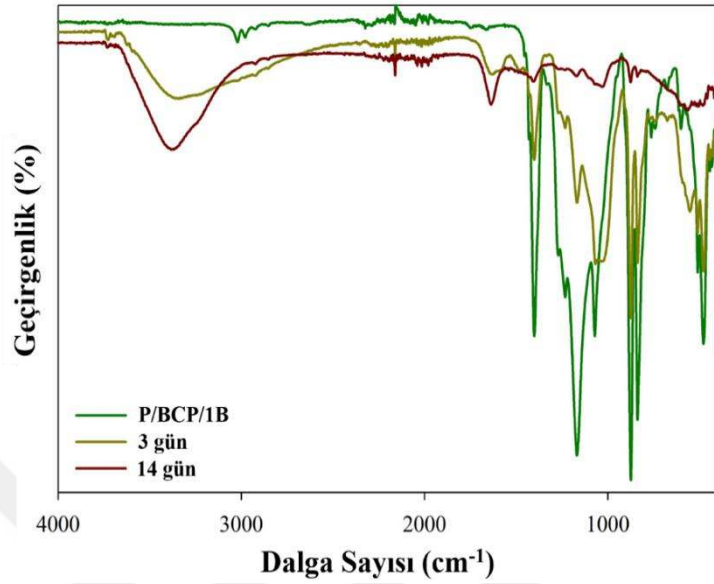
Apatit çekirdekleri oluştuktan sonra, SBF çözeltisi içerisinde bulunan Ca ve P iyonlarını tüketerek zamanla kendiliğinden büyür [188]. Tüm iskelelerin yüzeyinde apatit çekirdeklenmesinin meydana geldiği ve çekirdekli apatit birikiminin 14 günlük inkübasyona kadar kademeli olarak arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, kompozit iskelelerdeki bor içeriğinin artmasıyla iskelelerin yüzeylerinde biriken apatitlerin kütlesi de göreceli olarak artmıştır. PVDF esaslı iskelelerin yüzeyinde *in vitro* apatit büyüme sürecinin karakteristiği olan karnabahar benzeri morfolojide kümelenmiş apatit granüllerinin varlığı, Şekil 2.13'te görülmektedir. İnkübasyon öncesi SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında (Şekil 2.4), tüm iskelelerin yüzeyinde apatit birikiminin gerçekleştiği, bunun CaP katmanı oluşumuna yol açtığı ve iskelelerin biyoaktif özelliğe sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Öte yandan, benzer bir çalışmada raporlandığı gibi iskelelerin yüzeyindeki apatit büyümesinin bazı bölgelerde tekdüze olmaması, daha uzun daldırma süreleri ile aşılabılır [188].

SEM analizine ek olarak, iskelelerin biyoaktivitesini daha fazla araştırmak için tamamlayıcı bir araç olarak EDS kullanılmıştır. SEM görüntüsünde membran iskelelerinin yüzeyinde rastgele bir alan seçilerek gerçekleştirilen SEM-EDS analizinin spektrumları Şekil 2.14'te verilmiştir. EDS sonuçları, biyoaktif iskelelerin apatit fazına atfedilen Ca ve P elementlerinin varlığını doğrulamıştır. Çekirdeklenmenin gerçekleştiği bölgelerde yoğunlaştığı tespit edilen Ca ve P elementleri, iskelelerdeki çekirdekli katmanın apatit olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle P/BCP/0,5B ve P/BCP/1B numunelerinin yüzeyinde oluşan apatit tabakasının Ca ve P elementlerinin oranının, doğal kemiğin 1,67 olan Ca/P oranından daha yüksek olduğu söylenebilir.



Şekil 2.14 : 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerin: (a) SEM görüntüsü; (b) (a)'da belirtilen alanın EDS analiz spektrumu.

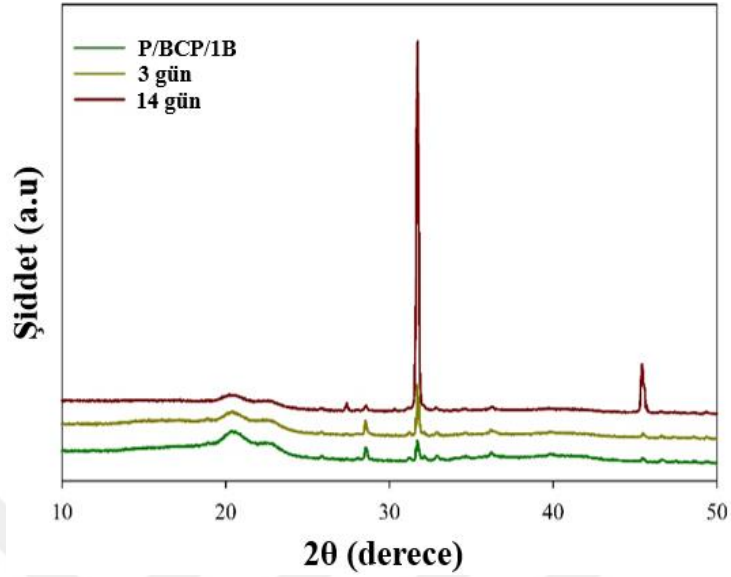
10xSBF'de 3 ve 14 gün boyunca inkübasyondan önce ve sonra seçilen P/BCP/1B numunesinin yüzey kimyasal bileşimindeki değişiklikler Şekil 2.15'teki ilgili FTIR spektrumlarında görülmektedir.



Şekil 2.15 : 3 ve 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelenin FTIR spektrumu.

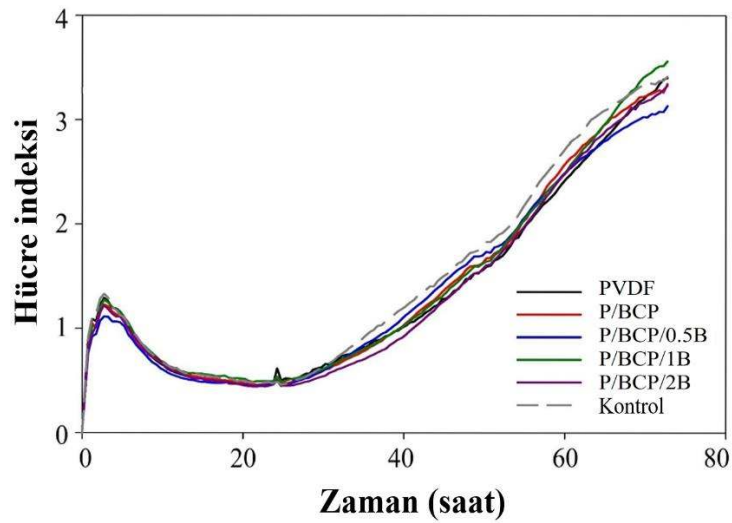
Bölüm 2.3.2.1'te belirtilen PVDF, BCP ve borun karakteristik pikleri 3 ve 14 günlük inkübasyondan sonra görülmeye devam ederken, bazı fonksiyonel gruplara atfedilen pikler kademeli olarak azalmıştır. Apatit oluşumu ve büyümesi sırasında meydana gelen değişiklikler, fosfat (PO_4^{3-}) gruplarının simetrik ve asimetrik gerilme modlarını temsil eden yeni absorban bantlarının ortaya çıktığını göstermektedir. Numunenin yüzeyinde bulunan karakteristik pikler, yaklaşık 870 cm^{-1} 'de SBF içerisinde inkübasyondan sonra apatit tabakasında yaygın olarak gözlenen karbonatlı apatit (CO_3^{2-}) ve yaklaşık 1375 cm^{-1} ve 1555 cm^{-1} arasında bulunan geniş bantta PO_4^{3-} 'ün varlığını göstermiştir. Diğer bir taraftan, inkübasyondan önce görülmeyen apatit tabakası üzerinde H_2O 'nun adsorpladığı O-H titreşimlerinin varlığı, yaklaşık 1650 cm^{-1} 'de ve 3100 cm^{-1} ile 3600 cm^{-1} arasında geniş bantta tespit edilmiştir. Numunenin inkübasyon öncesi ve sonrası FTIR spektrumları karşılaştırıldığında, apatit tabakasındaki pikler inkübasyon öncesi numuneye ait piklerden daha geniştir; bu durum, doğal kemiğe benzer şekilde apatit tabakasının düşük kristalliliğiyle ilişkilidir [58]. Şekil 2.16, inkübasyondan önce ve sonra seçilen P/BCP/1B numunesinin yüzeyindeki apatit tabakasının birikimini karşılaştırmak için XRD analizinin sonucunu

göstermektedir. Şekil 2.16 incelendiğinde, apatit tabakasına ait $2\theta = 26^\circ, 32^\circ, 46^\circ$ ve 48° 'deki kristal pikler açıkça görülmektedir [31].



Şekil 2.16 : 3 ve 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelenin XRD difragtogramı.

Hücrelerin migrasyonu, proliferasyonu ve iskele yüzeyine tutunması doku iskelelerinin biyouyumluluğunun bir göstergesidir. Biyouyumlu özelliğe sahip iskeleler, sitotoksik etki göstermeden hücrel tepkinin uyarılmasına izin vermektedir [183]. Üretilen membran iskelelerin sitotoksosite ve hücre çoğalmasının değerlendirilmesi, önceden belirlenmiş inkübasyon zaman aralıklarında L929 fare fibroblast hücrelerinin kullanıldığı WST-1 analizi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.17 : Membran iskelelerin sitotoksosite ve hücre canlılık değerleri.

Şekil 2.17 ve Çizelge 2.4, iskelelerin 24 ve 48 saatlik hücre maruziyeti dönemleri için sitotoksikite analizinin sonuçlarını göstermektedir. İskelelere ekilen L929 hücreleri, 24 saatlik inkübasyonun ardından polimer ağındaki toz içeriğine bağlı olarak farklı davranışlar sergilemiştir. Bununla birlikte, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm numuneler için hücre canlılığının %85'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Özellikle, ağ. %0,5 bor katkılı membran iskelelerden alınan numunelere ekilen hücrelerin canlılığı %97,4 olarak hesaplanmış olup, bu değer 24 saatte saf PVDF numunesinin %87,86 olan hücre canlılığından daha yüksektir. İnkübasyon süresinin 48 saate çıkarılması ile, özellikle ağ. %0,5 bor katkılı membran iskelelerden alınan numunenin hücre canlılığının %117,28 olarak kontrol grubuna göre artmasıyla sonuçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, iskelelerin herhangi bir sitotoksik etki göstermeden 48 saatlik inkübasyondan sonra bile arzu edilen hücre canlılığı ve çoğalması sergilediğini göstermiştir.

Çizelge 2.4 : Farklı oranlarda bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin hücre indeks değerleri.

Numune Kodu	24 saat (%)	48 saat (%)
PVDF	87,86	117,07
P/BCP	92,28	106,90
P/BCP/0.5B	97,45	98,85
P/BCP/1B	91,25	117,28
P/BCP/2B	88,13	106,39

Bu sonuçlar, membran formundaki kompozit iskelelerin biyolojik ortama uygun davranabilme yeteneğine sahip olduğunu doğrulamaktadır. Önceki bölümlerde tartışıldığı gibi, iskelelerin hidrofiliği ve β -faz fraksiyonu gibi farklı fiziksel ve piezoelektrik özelliklerin iyileştirilmesi PVDF matrisinde borun varlığına atfedilebilir [183,189]. Buna ek olarak, bor katkılı doku iskelelerinin daha yüksek hidrofiliği ve özellikle saf PVDF esaslı doku iskelelerine kıyasla ağ. %0,5 ve %1 bor içeren doku iskelelerinin daha yüksek β -fazı içeriğinin, hücre canlılığının artmasına neden olduğu söylenebilir. Bu gözlem, literatürde raporlanan PVDF esaslı kompozitlerin uyarıcı hücre davranışlarıyla ilgili çalışmalarla tutarlıdır [14,55,175]. Abzan ve çalışma ekibi [55], toz içeriğine bağlı olarak PVDF-grafen oksit membran doku iskelelerinin artan hidrofiliğinin ve β -faz içeriğinin, kültürlenmiş PC12 hücrelerinin bağlanması, çoğalması ve yayılması üzerindeki rolünü araştırmış ve hücre uyarıcısının işlevinin dikkate değer potansiyelini ortaya koymuştur. Diğer bir çalışmada, Santos ve çalışma ekibi [175], HA içeren PVDF bazlı membran doku iskelelerinde fibroblast hücrelerinin

yüksek canlılığı ve düşük sitotoksitesinin artan β -faz içeriği ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada üretilen farklı oranlarda bor katkılı BCP/PVDF esaslı geliştirilmiş fiziksel ve piezoelektrik özelliklere sahip membran doku iskelelerinin, L929 fibroblast hücrelerinin hücresel aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı ortaya konulmuştur.

2.4 Sonuçlar

Çalışmanın bu bölümünde, NIPS ve ardından liyofilizasyon tekniklerinin bir arada kullanımıyla bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskeleleri üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, NIPS tekniğinden kaynaklanan yoğun yüzey morfolojisine sahip iskelelerin, kesit morfolojisinin liyofilizasyon tekniğinden kaynaklanan birbirine bağlı gözeneklere sahip olduğunu göstermiştir. Bor katkılı kompozit doku iskeleleri yeterli şişme derecesi göstermesinin yanı sıra, bor katkı oranına göre yüzey ıslanabilirliği de arttırmıştır. Mekanik test sonuçları, iskelelerin iyi çekme dayanımı ve kopma uzaması özellikleriyle doğal kemiğe benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca üretilen PVDF esaslı iskelelerin β -faz fraksiyonuna sahip yarı kristalli bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. İskelelerin arzu edilen *in vitro* biaktivite, sitotoksite göstermeden uygun hücre canlılığı ve proliferasyonu sergilediği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, PVDF esaslı membranların, kemik doku uygulamalarında iskele malzemesi olarak uygun özelliklere sahip olduğunu doğrulamıştır.

3. KOAGÜLASYON BANYO SICAKLIĞININ BCP/PVDF ESASLI MEMBRAN İSKELELERİN ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

3.1 Giriş

Kritik boyuttaki kemik hasarlarının rekonstrüksiyonu klinisyenler için önemli bir zorluktur [16][190]. Kemik hasarlarının güncel tedavileri arasında altın standart olarak bilinen otogreftler, sınırlı kullanılabilirlik, donör bölgesi komplikasyonları, doku hastadan alındığı için hastalık bulaşma riski ve uzun operasyon süresi gibi kısıtlamalarla karşı karşıyadır [31]. Hastalığı olmayan donörlerden toplanan allogreftler ise, hastalık bulaştırma ve tedarik kaynaklı hasta morbiditesi riskini azaltsa da kırıklar, kaynamama, enfeksiyon ve immün yanıt gibi komplikasyonlara neden olma dezavantajlarına sahiptir [191]. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, çok çeşitli biyomalzemeler ve üretim teknikleri kullanılarak elde edilebilen fonksiyonel iskeleler tanıtılmıştır. Çeşitli doğal veya sentetik polimerler ile biyoaktif seramikler, bu iki farklı biyomalzeme sınıfının özelliklerinden yararlanmak için kompozit iskelelerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [30-32,192,193].

Florlu polimerler, biyoyumluluk, yüksek dielektrik sabiti ve kimyasal direnç gibi benzersiz özellikleriyle biyomedikal uygulamalar için giderek daha fazla ilgi görmektedir [189,194]. Bu polimerler arasında PVDF, dikkate değer piezoelektrik özellikleriyle öne çıkmaktadır [11,189,195]. PVDF, mekanik mukavemet sağlayan kristal faz ve polimere esneklik sağlayan amorf fazdan oluşan yarı kristal bir yapıya sahiptir. Diğer bir taraftan, kalsiyum fosfat esaslı biyoaktif seramikler, yüksek biyoyumlulukları ve doğal kemiğin mineral bileşimine yakın benzerlikleri nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir [32]. Kalsiyum fosfatların farklı fazları arasında, hidroksiapatit (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ve β -trikalsiyum fosfattan (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) oluşan BCP sahip olduğu özellikleriyle öne çıkmaktadır. Mükemmel biyoaktivitesi ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle, daha stabil HA'nın daha çözünür β -TCP'ye oranı düzenlenerek modüle edilebilmektedir [35,36]. Diğer bir taraftan, doğal kemikteki eser elementler, kemik hasarlarının tedavisi için biyomalzemelerin hazırlanmasında ilgi odağı olmuştur [154]. Kemikte doğal olarak eser element ($<0.1\%$)

olarak bulunan üç değerlikli bir iyon olan bor (B), kemik mineralizasyonu ve büyümesinde önemli bir rol oynar [98,154]. Ek olarak, kalsiyum fosfatlara bor katkısının saf kalsiyum fosfatların apatit oluşturma yeteneğini, biyolojik olarak parçalanabilirliğini, hücre çoğalmasını ve osteogenik aktivitesini artırdığı bildirilmiştir [196].

Membran doku iskeleleri üretmek için kullanılan çok çeşitli yöntemler arasında NIPS, farklı morfolojilere sahip membranların kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir bir şekilde hazırlanmasına olanak tanımaktadır [176,197]. NIPS prosesinde homojen bir polimer çözeltisi uygun bir altlık üzerine dökülür ve çözücü olmayan bir banyoya daldırılarak çökeltir. Çöktürme sırasında, polimer ve çözücü arasındaki afinite, çözücü olmayan maddeyle temas ettiğinde azalır. Bu durum, sıvı-sıvı faz ayırma neden olur [198]. Bu faz ayrımı, iki fazın birbirine nüfuz eden bir ağının oluşmasına yol açar; polimeri ve çözücünün bir kısmını içeren yüksek polimer konsantrasyonlu bir faz ve çözücü olmayan ve artık çözücüyü içeren düşük polimer konsantrasyonlu bir faz. Polimer açısından zengin faz membranın yapısını oluştururken, polimer açısından fakir faz membran içindeki gözenekli kanalları oluşturur. Membranın yüzeyindeki daha hızlı çökme, iç taraftaki çözücünün uzaklaştırılmasını yavaşlatır. Bu durum, yüzeyde daha küçük gözeneklere ve iç kısımda daha büyük gözeneklere yol açar. Çözücünün dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmasından sonra, çözücü olmayan faz ayrımı prosesinin koşulları uygun şekilde modüle edilerek istenen özelliklere sahip yapılar üretilebilmektedir. Döküm çözeltisinin bileşimi, çözücü ve çözücü olmayan maddeler, koagülasyon banyosu ortamı ve sıcaklığı gibi çeşitli parametreler membran iskelelerin özelliklerini etkileyebilmektedir [56]. Bu parametreler arasında en etkili olan, koagülasyon banyosunun sıcaklığıdır. Proses parametrelerini içeren çalışmalar incelendiğinde, Abzan ve çalışma ekibi [55], PVDF esaslı doku iskelelerini geliştirmek için N-TIPS (çözücü olmayan faz ayrımı ve termal olarak indüklenen faz ayrımı kombinasyonu) tekniğini uygulamış ve çözücü bileşimi ile koagülasyon banyosuna daldırma süresinin etkilerini araştırmıştır. Elde edilen sonuçlar, proses parametrelerine bağlı olarak PVDF doku iskelelerinde gözenek boyutu, mekanik özellikler, β -faz fraksiyonu, kristallik ve PC12 hücre aktivitesinin önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir. Balzamo ve çalışma ekibi [199], NIPS işlemi sırasında koagülasyon banyosunun sıcaklığının kontrol edilmesiyle kolayca ayarlanabilen asimetrik gözenek yapısı ve kontrollü gözenek boyutu elde edilebileceğini raporlanmıştır. Bir diğer çalışmada [57], koagülasyon

banyosunda artan sıcaklıkların asimetrik morfolojinin ortaya çıkmasını kolaylaştırdığı raporlanmıştır. Diğer bir çalışmada ise, koagülasyon banyo sıcaklığının 20 °C'den 60 °C'ye yükseltilmesi gözenek boyutunda ve β -PVDF içeriğinde azalmaya neden olurken, temas açısı değerlerinin arttığı belirtilmiştir [200].

Bununla birlikte, NIPS tekniği esas olarak PVDF esaslı membranları geliştirmek için uygulanmış olmasına rağmen, proses parametrelerinin PVDF'in kristallliği, β -faz oluşumu, mekanik ve biyolojik özellikleri üzerindeki etkileri yeterince araştırılmamıştır. Çalışmanın bu bölümünde, ilk bölümde seçilen ağ. %1 bor katkılı BCP tozları ile takviyelendirilen PVDF esaslı iskeleler, çözücü olarak N,N-dimetilformamid (DMF) ve çözücü olmayan olarak DMF/saf su karışımı kullanılarak farklı sıcaklıklara ayarlanan koagülasyon banyosunda üretilmiştir. Koagülasyon banyosu sıcaklığının, üretilen iskelelerin morfolojisi ve yüzey özelliklerinin yanı sıra, yapısal, termal, mekanik ve biyolojik özellikleri üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

3.2 Deneysel Çalışmalar

3.2.1 Malzemeler

Çalışmanın bu bölümünde, ilk bölümde sentezlenen ağ. %1 bor katkılı BCP tozları takviye malzemesi olarak kullanılmıştır. Matris malzemesi olarak molekül ağırlığı 573,10⁻³ g/mol olan PVDF, Solvay (Solef® 1015) firmasından satın alınmıştır. PVDF'in çözücüsü olarak kullanılan Solvay firmasından temin edilen DMF, koagülasyon banyosunda saf su ile birlikte çözücü olmayan madde olarak kullanılmıştır. Üretilen membran doku iskelelerinin biyoaktivite çalışmalarında kullanılmak üzere sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat (CaCl₂.2H₂O), magnezyum klorür heksahidrat (MgCl₂.6H₂O) ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (NaH₂PO₄.H₂O) Merck™ (Almanya) firmasından ve sodyum bikarbonat (NaHCO₃) Sigma-Aldrich™ (Almanya) firmasından satın alınmıştır. İskelelerin şişme çalışmalarında kullanılan fosfat tampon çözeltisi (DPBS, pH 7.4), Gibco™ (ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.2.2 Ağ. %1 bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretimi

Çalışmanın ikinci bölümünde, ilk bölümde sentezlenen ağ. %1 bor katkılı BCP tozları PVDF'e katkılandırılarak -5 °C, 0 °C, 10 °C ve 20 °C olmak üzere farklı koagülasyon

banyo sıcaklıklarında dört farklı membran doku iskelesi NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleri ile üretilmiştir. PVDF çözeltisi, çözeltinin toplam katı konsantrasyonu ağı. %18'de sabit tutularak PVDF'in DMF içerisinde 60 °C'de 24 saat boyunca çözülmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra, çözeltiye ağı. %1 bor katkılı BCP tozları PVDF'in ağı. %10'u konsantrasyonunda olacak şekilde eklenerek homojen bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen kompozit çözelti, 200 µm'lik film olarak bir cam altlık üzerine dökülmüştür. Her bir film için önceden sırasıyla -5 °C, 0 °C, 10 °C ve 20 °C'ye ayarlanmış 60:40 hacim oranında DMF:saf su karışımı içeren koagülasyon banyosu içerisine daldırılan filmler, 3 saat sonra banyodan çıkartılmıştır. Koagülasyon tamamlandıktan sonra elde edilen membranlar dikkatlice cam altlıktan ayrılmış ve kalan çözücünün uzaklaştırılması için 48 saat boyunca saf su banyosunda durulanmıştır. Durulanan membranlar -80 °C'de 4 saat boyunca bir liyofilizatörde (Toros™ TRS-2/2V) liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyonda kullanılan düşük basınç 0,05 mbar olarak ayarlanmıştır. Bu sayede süblimleşme etkin bir şekilde gerçekleşmekte, kurutulan malzemenin yapısal bütünlüğü ve stabilitesi korunmaktadır. Koagülasyon banyo sıcaklığına bağlı olarak iskeleler sırasıyla P-5, P0, P10, ve P20 olarak adlandırılmıştır. Hazırlanan kompozit membran doku iskelelerinin kimyasal kompozisyonları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağı. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin döküm çözeltisi bileşimleri.

Numune Kodu	Çözelti bileşimleri	
	PVDF (%ağı.)	Bor katkılı BCP (%ağı.)
P-5	16,2	1,8
P0	16,2	1,8
P10	16,2	1,8
P20	16,2	1,8

3.2.3 Karakterizasyon

3.2.3.1 Ağı. %1 bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin karakterizasyonu

Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen membran iskelelerin yüzey ve kesit morfolojileri, EDS ile entegre bir FE-SEM (Carl Zeiss™/Gemini 300) kullanılarak 2 ila 5 kV arasında değişen hızlanma voltajında görüntülenmiştir. Kesit görüntüleri için, numuneler sıvı azot içerisinde dondurularak kırılmıştır. Görüntüleme öncesi

numunelerin yüzeyi altın-paladyum tabakası ile kaplanmıştır. İskelelerin ortalama gözenek boyutları, SEM görüntüleri kullanılarak Image J 1.520 yazılımı ile en az yüz gözenegin çapı ölçülerek hesaplanmıştır.

İskelelerin kristal faz yapısı, X-ışını difraktometresi (XRD, Bruker™ AXS-Discovery D8) kullanılarak monokromatik Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) radyasyonu ile 40 kV potansiyel fark, 40 mA akım ve $2\theta = 5^\circ\text{--}60^\circ$ tarama aralığı koşullarında tespit edilmiştir. Mevcut kristalin fazlar, Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi veri tabanı kullanılarak tanımlanmıştır.

İskelelerin yüzey ıslanabilirliği, bir temas açısı analizörü (Biolin Scientific™/Attension Theta Flex) ile sabit damla yaklaşımıyla PBS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açısı ölçümlerinde, numune yüzeylerine 5 μL 'lik damlalar otomatik olarak dağıtılmış ve temastan 5 saniye sonra alınan damlacık görüntülerindeki açılar hesaplanmıştır. Çalışmalar üç paralel numune ile yürütülmüş ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

İskelelerin termal davranışı ve toplam kristallliği, DSC (TA Instrument/DSC25) kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler, alüminyum pen içerisindeki 7-8 mg numunenin -90°C 'den 200°C 'ye ısıtılması ve $10^\circ\text{C}/\text{dakika}$ ısıtma hızı -90°C 'ye soğutulması ile azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Erime ve kristalleşme sıcaklıkları sırasıyla ısıtma ve soğutma eğrilerinin tepe sıcaklıklarında belirlenmiş, erime entalpisi, ilk ısıtma eğrisinin 120 ila 170°C arasındaki sıcaklıklardan entegre edilerek hesaplanmıştır. Numunelerin toplam kristallliği X_C ise, Denklem 2.2 kullanılarak DSC termogramlarından hesaplanmıştır.

PVDF esaslı iskelelerin içerisindeki bağlı β fazı içeriği, ATR-FTIR (Thermo Nicolet iS50) spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. FTIR spektrumları 400 ila 4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında, 14 cm^{-1} çözünürlükte ve 16 tarama ile kaydedilmiştir. İskelelerin bağlı β fazı içeriği F_β ise, Denklem 2.3'e göre hesaplanmıştır.

İskelelerinin mekanik dayanımı, bir statik mekanik test cihazı (Shimadzu™ AGS-X) kullanılarak eşit boyutlarda kesilen numunelerin üzerine 1 kN 'luk yük hücresi ile 50 mm/dk 'lık sabit hızla kuvvet uygulanması ile ölçülmüştür. Çalışmalar üç paralel numune ile yürütülmüş ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

İskelelerin *in vitro* şişme çalışmaları için, iskeleler eşit ağırlıkta küçük parçalar halinde kesilmiş ve kuru ağırlıkları bir hassas terazide (Shimadzu™ - AUX321; $\pm 0,0001 \text{ g}$

duyarlılık) tartılmıştır. Daha sonra, iskelelerden kesilen numuneler kapaklı cam şişelerde 30 mL PBS içerisinde (pH 7,4) 37 °C sabit sıcaklıkta 1, 7, 14, 21 ve 28 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası şişelerden çıkartılan numunelerin yüzeylerindeki sıvı hafifçe uzaklaştırılmış ve numunelerin şişme oranı Denklem 2.1'e göre hesaplanmıştır. Çalışmalar üç paralel numune ile yürütülmüş ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

İskelelerin *in vitro* biyoaktivite deneyleri, 10xSBF içerisinde gerçekleştirilmiştir. 10xSBF, Çizelge 2.2'de listelenen ilk beş reaktifin sırasıyla 900 mL ultra saf su içerisinde çözülmesi, daha sonra hacmin ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlanarak bir stok çözelti hazırlanması ve ardından hazırlanan stok çözeltiden alınan 100 mL'lik çözeltinin konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde içerisinde NaHCO_3 ilave edilerek pH değerinin bir pH metre ile (Seven Compact Duo S214, Mettler™ Toledo) 7,4'e ayarlanması ile toplam 1000 mL olarak hazırlanmıştır. Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen iskelelerden eşit boyutlarda kesilen numuneler 3 ve 14 gün boyunca 10xSBF içerisinde inkübe edilmiş ve inkübasyonun ardından, yavaşça çözelti içerisinde çıkartılan numuneler saf su ile hafifçe yıkanarak ve -20 °C'de dondurulduktan sonra -80 °C'de liyofilizatörde 4 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Numunelerin yüzeyinde oluşan apatit katmanının morfolojisi ve bu katmanın Ca/P oranı FE-SEM ve EDS (EDS, Bruker™ XFlash 6I100) kullanılarak karakterize edilmiştir. Apatit oluşumunu tespit etmek için XRD (Bruker™ AXS-Discovery D8) kullanılmış ve Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) radyasyonu ile 40 kV potansiyel fark, 40 mA akım ve $2\theta = 10^\circ - 50^\circ$ tarama aralığı koşullarında çalışılmıştır. Numunelerin yüzeyindeki apatit tabasında bulunan OH^- , CO_3^{2-} ve PO_4^{3-} fonksiyonel gruplarının varlıkları 400 – 4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında alınan ATR-FTIR spektrumları ile gösterilmiştir.

İskelelerin *in vitro* sitotoksosite ve hücre canlılıklarının ölçümünde xCELLigence RTCA sistemi (ACEA Biosciences, ABD) kullanılmıştır. WST-1 testi, L929 fare fibroblast hücre dizisinin 24 saat boyunca bir E-Plakaya 16'ya (ACEA Biosciences) ekilmesi (15×10^3 hücre/kuyu) ve hücre empedansının 120 saat boyunca her 30 dakikada bir ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Muamele edilmemiş L929 hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır.

Tüm kantitatif veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak rapor edilmiştir. İskelelerin şişme oranı, gözeneklilik ve çekme dayanımı verilerinin istatistiksel

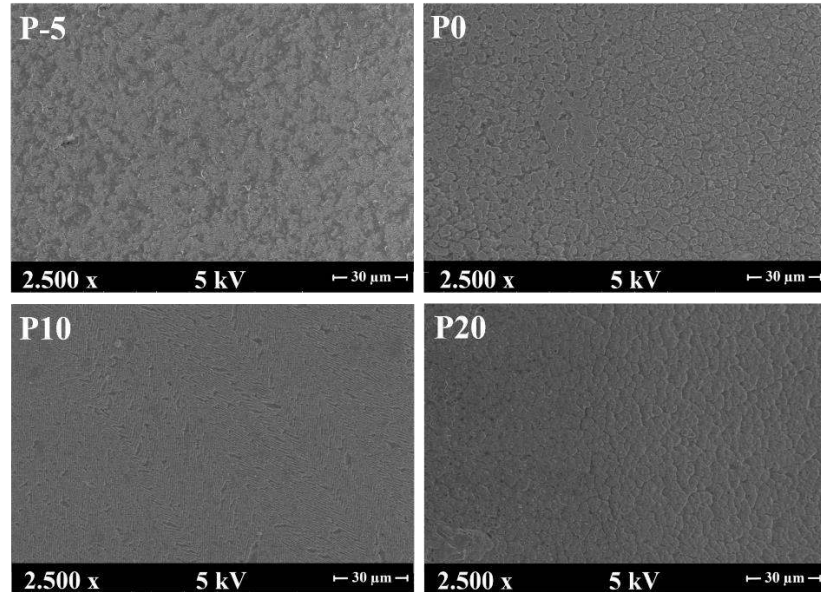
analizlerini gerçekleştirmek için Microsoft Excel ve Origin yazılımı (Origin Lab) kullanılmıştır. Hücre canlılığı ve sitotoksisite deneylerinin istatistiksel analizleri bir yönlü ANOVA ile gerçekleştirilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar P değeri <0,05 olacak şekilde uygulanmıştır.

3.3 Bulgular ve Tartışma

3.3.1 Ağ. %1 bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin karakterizasyonu

3.3.1.1 Morfolojik ve yüzey özellikleri

Hasarlı kemiğin yenilenmesinde optimum bir mikro ortamın oluşumunu kolaylaştırmak için iskelelerin yapısal ve mekanik olarak doğal ECM'ye benzer olması gerekir. İdeal bir doku iskelesi, yapı içerisinde hücre tohumlanmasını ve difüzyonunu arttırmak için birbirine bağlı bir gözenek ağı ile yüksek gözeneklilik ve yeterli gözenek boyutu gibi spesifik morfolojik özelliklere sahiptir [201]. İskelenin morfolojik yapısı, NIPS tekniğinde çözücü ve çözücü olmayan maddelerin değişim oranı ayarlanarak hassas bir şekilde düzenlenebilmektedir [55]. NIPS tekniğinde polimer kristalizasyonu için itici güç olarak değişen koagölasyon banyo sıcaklıklarında üretilen membran doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri şekil 3.1'de gösterilmektedir.

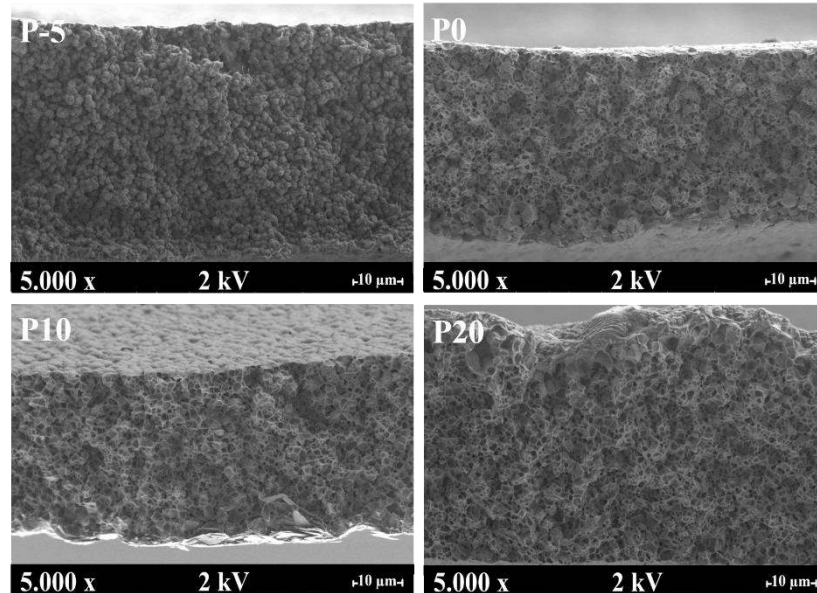


şekil 3.1 : Farklı koagölasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri.

Şekil 3.1'de görüldüğü gibi, PVDF esaslı iskeleler yoğun bir yüzey katmanı ve bu katmanın altında sünger benzeri bir yapı ile karakterize edilen asimetrik bir morfoloji sergilemektedir. Yüzey morfolojisi, polimerik filmin koagülasyon banyosuna daldırılması ile çözücü ve çözücü olmayan maddenin hızlı değişimin bir sonucu olarak yoğun bir yüzey tabakasının oluşumunu açıkça ortaya koymaktadır. Bu değişim işlemi, çözücünün polimerik filmin yüzeyi boyunca hızlı bir şekilde dağılması, koagülasyon banyosundan dışarı doğru akması ve aynı zamanda çözücü olmayan maddenin banyodan filme doğru çekilmesiyle başlar. Yüzeye yayılan çözücü, polimer zincirlerini yüzeye taşıyarak yoğun bir kabuk tabakasının oluşmasına neden olur [202].

Koagülasyon banyo sıcaklığının iskele morfolojisi üzerindeki etkisi, termodinamik denge merceğinden aydınlatılabilir. Banyo sıcaklığının artırılması sistemin entropisini yükseltir ve Gibbs serbest enerjisini azaltır. Serbest enerjideki bu azalma, koagülasyon banyosu içindeki çözücü ve çözücü olmayan madde değişimini yavaşlatır, polimer zincirlerinin organize olması ve çökmesi için daha fazla zaman tanır, böylece yoğun bir yüzey tabakası ve daha yüksek gözenekliliğe sahip bir altyapı oluşur [203].

Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında NIPS tekniği ile üretilen membran doku iskelelerinin kesit SEM görüntüleri Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin kesit SEM görüntüleri.

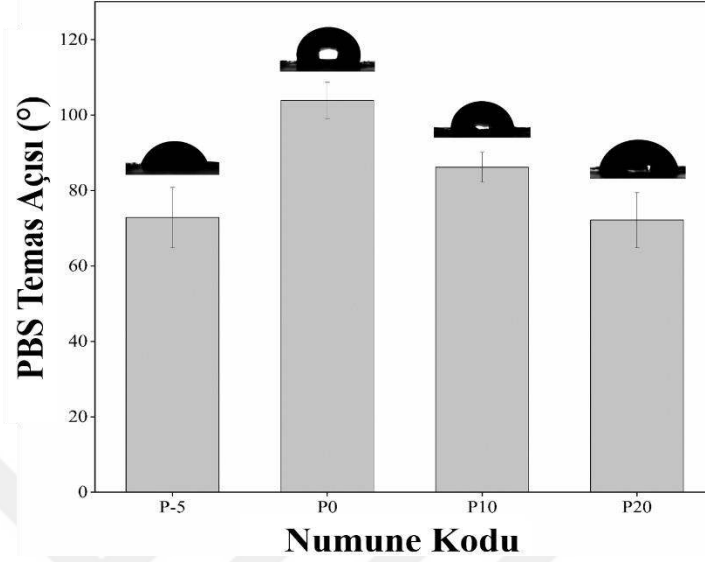
Şekil 3.2 incelendiğinde, iskelelerin birbirine bağlı, oldukça gözenekli bir kesit morfolojisi sergilediği görülmektedir. Bununla birlikte, koagülasyon banyo sıcaklığı arttıkça iskelelerdeki ortalama gözenek boyutunun önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Ancak, -5 °C'de hazırlanan numunenin kesit görüntüleri tamamen nodüler/küresel bir yapının ortaya çıktığını ortaya koymuştur. P-5 numunesinde çözücü ve çözücü olmayan maddenin difüzyon hızı, katı-sıvı karıştırma işleminden kaynaklanan polimer kristalizasyonuna atfedilen, daha küçük gözeneklere sahip nodüler bir yapının gelişmesine yol açmıştır [204]. Özellikle düşük banyo sıcaklıkları, çözücü kristallerinin çekirdeklenmesi ve büyümesi için sürenin kısılmasını ve daha küçük gözeneklerin oluşumuna neden olmaktadır. Diğer bir taraftan, banyo sıcaklığının -5 °C'den 20 °C'ye yükseltilmesi, gözenekliliğin giderek artmasıyla birlikte yapıyı daha düşük nodülerliğe kaydırır. Numunelerin gözenekliliği P-5, P0, P10 ve P20 numuneleri için sırasıyla 0, 0,75 ± 0,2 µm, 1,14 ± 0,31 µm, 1,99 ± 0,79 µm olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla, en yüksek gözenekliliğe sahip kesit morfolojisinin P20 numunesinde olduğu söylenebilir. Abzan ve çalışma ekibinin yaptığı benzer bir çalışmada [55], -10 °C, 0 °C ve 20 °C olmak üzere değişen koagülasyon banyo sıcaklıklarında hazırlanan PVDF esaslı iskelelerde de benzer eğilimler gözlemlendiği, daha düşük banyo sıcaklıklarında hazırlanan iskeleler daha küçük gözenekler sergilerken, 20 °C'de hazırlanan iskelelerin daha büyük gözeneklere sahip olduğu raporlanmıştır. Cordaso ve çalışma ekibi [176], NIPS tekniğini kullanarak poli(vinilidenflorür-ko-klorotrifloroetilen) – P(VDF-CTFE) membranlarını üretmiş ve koagülasyon banyo sıcaklığını etkilerini incelemiştir. Elde edilen sonuçlar, banyo sıcaklığının 50 °C'den 75 °C'ye çıkarılmasının birbirine bağlı daha büyük mikro gözeneklerin oluşumuyla sonuçlandığını göstermiştir.

Bununla birlikte, gözeneklilik ölçümleri gözenek boyutlarının 10 ila 30 µm arasında değişen tipik osteoblast hücre boyutlarından önemli ölçüde daha küçük olduğunu göstermektedir. Bu tutarsızlık, osteoblastların bu gözeneklere doğrudan göçünün sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, gözenekler arası bağlantı, hücrel deformasyon, matris yeniden şekillenmesi ve şişme gibi çeşitli mekanizmalar ve faktörler, hücre göçünü ve bu iskelelere nüfuz etmeyi kolaylaştırabilir [205-207]. Gözenekler arası bağlantı açısından, tek tek gözenek boyutları hücrelerden daha küçük olsa bile, gözeneklerin birbirine bağlı yapısı hücrelerin iskelede daha derine nüfuz etmesi için yollar sağlayabilir [205]. Bu sayede, bu birbirine bağlı gözenek ağı sürekli

rotalar sağlayarak hücre göçünü destekleyebilir. Hücresel deformasyon ile ilgili olarak, osteoblastlar ve diğer hücreler daha küçük açıklıklardan deforme olma ve sıkışma yeteneğine sahiptir. Bu esneklik, hücrelerin daha küçük gözeneklerden geçmesine izin vererek nüfuz etme ve göç yeteneklerini artırır. Matris yeniden şekillenmesi açısından, osteoblastlar da dahil olmak üzere hücreler, hücre dışı matrisi parçalayan ve yeniden şekillendiren enzimler salgılayabilir; hücre göçünü ve çoğalmasını sağlamak için zamanla gözenek boyutlarını büyütebilir [206]. Öte yandan, iskelenin fizyolojik bir ortamda şişme davranışı hücre göçüne daha fazla yardımcı olabilir. İskele şiştikçe, gözenek boyutları artabilir ve bu da daha kolay hücre infiltrasyonuna izin verir. Böylece şişme, besin ve oksijen difüzyonunu artırarak hücre büyümesi ve çoğalması için daha elverişli bir ortam yaratabilir [206]. Bu genişleme, başlangıçtaki gözenek boyutu ile hücre boyutu arasındaki boşluğu kapatmaya yardımcı olabilir [207,208]. Sonuç olarak, gözenekler arası bağlantı, hücresel deformasyon ve iskele şişmesinin birleşimi, başlangıçtaki küçük gözenek boyutlarına rağmen osteoblast göçünü ve penetrasyonunu destekleyen dinamik bir ortam yaratır. Çalışmanın bu bölümünde elde edilen bulgular, daha yüksek koagülasyon banyosu sıcaklıklarında hazırlanan gözenekli yapıya sahip PVDF esaslı doku iskelelerinin, büyüyen hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve göçünü kolaylaştırarak kemik doku uygulamaları için umut vaat ettiğini göstermektedir.

Hücresel aktiviteyi önemli ölçüde etkileyen bir diğer özellik ise, iskelelerin yüzey ıslanabilirliğidir. İdeal bir iskele, 90°'den daha küçük bir damlacık temas açısı ile karakterize edilen hidrofilik bir yüzeye sahiptir. Protein faktörlerinin emilimini destekleyerek hücre bağlanmasını arttırmak, hidrofilik yüzeylere sahip doku iskeleleri ile sağlanabilmektedir [31,183]. PVDF, sahip olduğu üstün özellikleriyle elektromekanik uygulamalar için arzu edilen bir polimer olmasına rağmen, kemik doku mühendisliği uygulamalarında hücrelerle etkili bir şekilde bağlanmak ve etkileşimi sağlamak için uygun yüzey ıslanabilirliği kriterini de karşılamalıdır. Ancak, PVDF'in doğal yüzey hidrofobikliği hücre bağlanmasını sınırlayarak fizyolojik etkileşimlere elverişsiz olmasına neden olmaktadır [209]. Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran iskelelerden kesilen numunelerin yüzeylerinde PBS temas açısının ölçülmesiyle elde edilen ortalama yüzey ıslanabilirliği değerleri Şekil 3.3'te verilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde su temas açısı yerine PBS temas açısı ölçümlerinin gerçekleştirilmesinin

nedeni, Bölüm 2.3.2.2’de farklı ortamlar kullanılarak gerçekleştirilen karşılaştırmalı temas açısı ölçümlerinin sonucunda PBS ile arzu edilen temas açısı değerlerine yaklaşılmıştır.



Şekil 3.3 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin PBS temas açısı değerleri.

Şekil 3.3'te gösterildiği gibi, en yüksek PBS temas açısı değeri P0 numunesi için $103,86^{\circ} \pm 4,79^{\circ}$ olarak ölçülmüştür. Koagülasyon banyo sıcaklığının artırılması, P10 ve P20 numuneleri için PBS temas açısının sırasıyla $86,14^{\circ} \pm 3,95^{\circ}$ ve $72,15^{\circ} \pm 7,31^{\circ}$ 'ye düşmesiyle yüzey hidrofilikliğini önemli ölçüde arttırmıştır. Bu farklılıklar benzer çalışmalardan elde edilen bulgularla tutarlı olarak, iskele yüzeylerindeki gözenek sayısı ve yüzey pürüzlülüğündeki değişikliklere atfedilebilir [56,200]. Diğer bir taraftan, en düşük PBS temas açısı değeri P-5 numunesi için $57,81^{\circ} \pm 5,36^{\circ}$ olarak ölçülmüştür. Bunun nedeni, P-5 numunesinin nodüler/küresel yapılarının numunenin yüzey özelliklerini etkilemesi olabilir. Daha küçük gözeneklere sahip bu nodüler/küresel yapı, gözenek boyutu ölçüm sonuçlarında tartışılan düşük sıcaklıklarda çözücü ve çözücü olmayan maddenin difüzyon hızından kaynaklanmaktadır. Bu yapı, daha yüksek sıcaklıklarda hazırlanan, daha büyük gözenek boyutlarına ve daha pürüzsüz yüzeylere sahip numunelerle karşılaştırıldığında yüzey pürüzlülüğünü artırır. Böylece, P-5 numunesindeki daha küçük gözenekler ve daha nodüler yapı, daha yüksek yüzey pürüzlülüğüne katkıda bulunur. Yüzey pürüzlülüğü, yüzeyin ıslanabilirliğini değiştirerek hidrofilisiteyi önemli ölçüde etkiler. Tipik olarak, yüzey pürüzlülüğündeki artış, su etkileşimi için mevcut olan daha büyük yüzey alanı nedeniyle hidrofilisiteyi artırır. P-5 numunesi

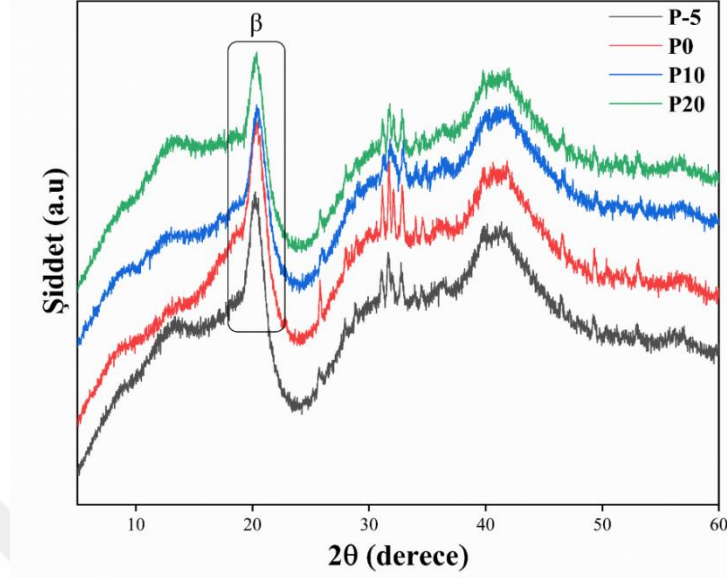
için, yüksek yüzey pürüzlülüğüne rağmen, nodüler/küresel yapı, görünür temas açısını artırabilen ve hidrofobik bir görünüme yol açabilen hava cepleri oluşturur. Hidrofilik yüzeyler daha düşük temas açısı sergiler. Ancak, temas açısı yüzey pürüzlülüğünden ve yapısal özelliklerden etkilenebilir. P-5 numunesinde, artan yüzey pürüzlülüğü ve nodüler yapı, malzemenin doğal hidrofilisitesine rağmen, sıkışmış hava nedeniyle daha yüksek bir temas açısı ile sonuçlanır. P-5 için, pürüzlülüğünden beklenen hidrofobisiteye rağmen daha düşük temas açısı gösteren çelişkili sonuçlar, özgül yüzey morfolojisinden kaynaklanmaktadır. Yüksek pürüzlülük ve nodüler yapı, yüzey alanını artırarak hidrofilisiteyi artırır ve bu da daha düşük bir temas açısıyla sonuçlanır. Nodüler yapısı ve daha küçük gözenekleri de dahil olmak üzere P-5 numunesinin benzersiz yüzey özellikleri, ıslanabilirliğini önemli ölçüde etkileyerek gözlemlenen bu tutarsızlıklara yol açmıştır. Özetle, P-5 numunesinin nodüler/küresel yapısı ve artan yüzey pürüzlülüğü hidrofilisitesini artırarak daha düşük bir temas açısı ile sonuçlanır. Bu gözlemler, SEM görüntüleri ve ölçülen temas açısı değerleriyle uyumludur ve çelişkili sonuçları açıklamaktadır.

3.3.1.2 Fizikokimyasal, termal ve mekanik özellikler

Koagülasyon banyo sıcaklığının modüle edilmesi, PVDF esaslı membran iskelelerin farklı kristal polimorflarının ayarlanması için etkili bir stratejidir. PVDF'in α , β , γ , δ ve ϵ olmak üzere polimorflarının her biri, iskelelerin performansını etkileyecek benzersiz özelliklere sahiptir [200,210,211]. Bu özelliklerden biri olan piezoelektriklik, gerekli elektromekanik uyarıları sağlayarak kemik rejenerasyon stratejilerini iyileştirmektedir [89,90]. Bununla birlikte, PVDF'nin yalnızca β ve γ fazları piezoelektrik özelliklere sahip olup, β -PVDF'in bu özelliği γ -PVDF'ninkinden daha yüksektir [10].

Değişen koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen PVDF esaslı iskelelerin kristal fazlarının yapısı XRD ile belirlenmiştir. Şekil 3.4'te verilen difraktogramlarda PVDF'in α fazı, (020) ve (001) Miller indislerine bağlı olarak $2\theta = 18,4^\circ$ ve $26,5^\circ$ 'de görülen karakteristik pikleri sergilemiştir. Buna ek olarak, $a = 4,96 \text{ \AA}$, $b = 9,64 \text{ \AA}$, $c = 4,62 \text{ \AA}$, $\beta = 90^\circ$ monoklinik birim hücre boyutlarına sahip olan α -PVDF, P21/c uzay grubu ile endekslenmiştir. Diğer bir taraftan, PVDF'nin β -fazı, (110) Miller indisine atfedilen $2\theta = 20.04^\circ$ 'de kırınım piklerinin varlığını göstermiştir. Kristalin β -PVDF'in

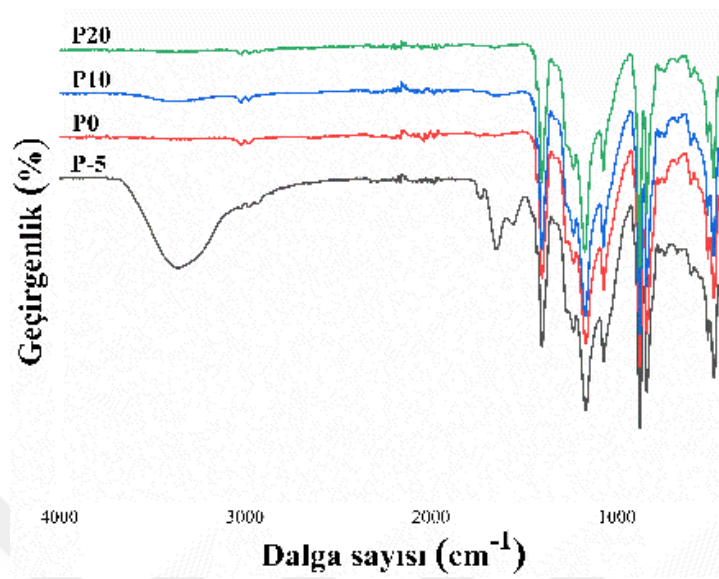
ortorombik birim hücresi, Cm2m uzay grubuyla $a = 8,58 \text{ Å}$, $b = 4,91 \text{ Å}$, $c = 2,56 \text{ Å}$ olarak endekslenmiştir.



Şekil 3.4 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin XRD difraktogramları.

XRD sonuçlarıyla tutarlı olarak PVDF'in β -fazı, Şekil 3.5'teki FTIR spektrumunda gösterilmiştir. Şekil 3.5 incelendiğinde, 612 cm^{-1} , 763 cm^{-1} , 874 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} ve 1208 cm^{-1} 'de yer alan karakteristik bantlar, alternatif trans-gauche (TGTG; T-trans, G-gauche) konformasyonundan oluşan α -fazıyla ilişkilidir. 612 cm^{-1} ve 763 cm^{-1} 'de bulunan pikler, sırasıyla CF_2 bükülmesinin karma modu ve $\text{C}=\text{C}$ iskelet titreşimine atfedilmiştir. 510 cm^{-1} , 840 cm^{-1} , 1068 cm^{-1} , 1275 cm^{-1} ve 1424 cm^{-1} 'deki pikler ise düzlemsel all-trans zikzak zincir konformasyonuna sahip olan PVDF'nin β fazı ile ilişkilendirilmiştir. 510 cm^{-1} ve 840 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler, sırasıyla CH_2 sallanma ve CF_2 asimetrik gerilme titreşiminin karışık moduyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, 1232 cm^{-1} 'deki pik PVDF'in γ -fazını göstermektedir [13,175,212]. Daha yüksek koagülasyon banyo sıcaklıklarında hazırlanan iskelelerde α -fazına ilişkin pikler baskılanmış, 840 cm^{-1} ve 1275 cm^{-1} 'de β fazını temsil eden pikler net bir şekilde gözlenmiştir. Bu sonuçlar, daha yüksek banyo sıcaklığının β fazı oluşumunu desteklediğini doğrulamaktadır. Diğer bir taraftan, 474 cm^{-1} , 604 cm^{-1} ve 1092 cm^{-1} 'de bulunan spektrum bantları HA'nın PO_4^{3-} fonksiyonel grubunun titreşim moduyla ilişkilendirilmiştir. [175,182]. Ek olarak, P-5 numunesinde 1660 cm^{-1} 'de görülen pik ise, DMF'in $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşiminin modunun karakteristiği olarak bilinmektedir

[213]. P-5 numunesinde DMF'e ait pik görülmesinin nedeni, numunenin Bölüm 3.3.1.1'de tartışılan nodüler yapılarından kaçamaması olabilir.



Şekil 3.5 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağı. %1 bor katkılı membran iskelelerinin FTIR spektrumları.

Koagülasyon banyo sıcaklığının PVDF esaslı iskelelerin kristal yapısı üzerindeki etkisi, iskelelerin FTIR spektrumları ve kantitatif olarak Lambert-Beer yasasına (Denklem (2.3)) göre hesaplanan β -fazının bağıl fraksiyonu (F_β)'nin ölçülmesiyle belirlenmiştir. İskelelerin hesaplanan β faz oranları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

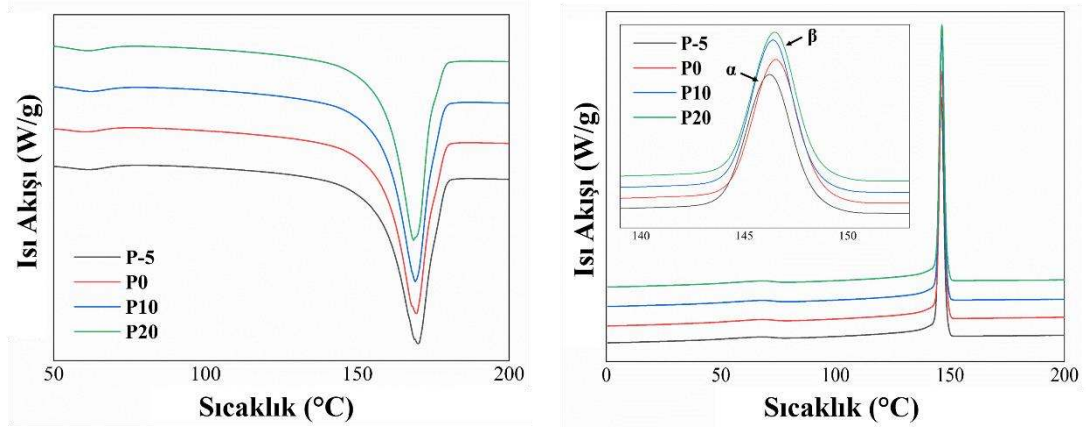
Çizelge 3.2 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağı. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin % kristallinite oranı ve β faz fraksiyonu.

Numune Kodu	$T_{m\alpha}$ (°C)	$T_{m\beta}$ (°C)	Kristalizasyon Sıcaklığı (°C)	Kristallinite (X_C) (%)	β faz oranı (F_β) (%)
P-5	168,77	170,03	146,21	58,53	74,00
P0	167,97	169,38	146,52	57,70	78,02
P10	167,94	169,08	146,38	60,02	79,98
P20	167,99	168,51	146,47	59,12	83,60

Çizelge 3.2 incelendiğinde, P-5 iskelesinin %74 olan β faz içeriğinin P20 iskelesi için %83'e yükseldiği görülmektedir. Bununla birlikte, koagülasyon banyo sıcaklığının artmasıyla β fazına ilişkin piklerin yoğunluğun arttığı Şekil 3.5'te görülmektedir. Yapılan çalışmalar, proses parametrelerinin, özellikle çözelti kristalizasyon sıcaklığının, PVDF esaslı doku iskelelerinin üretimi sırasında β -fazı oluşumunu önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir [55]. Döküm çözeltisinin oda sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta çözücü olmayan bir maddeye daldırılmasıyla, gecikmeli sıvı-sıvı ayrımı

meydana gelmekte ve PVDF'nin β -fazı oluşturulmaktadır. Dolayısıyla, sıcaklığın yaklaşık oda sıcaklığına kadar arttırılmasının, kristalizasyon ve büyüme aşamaları sırasında PVDF kristallerinin all-trans zigzag zincir konformasyonunda düzenlenmesini sağlayarak β -fazının oluşumunu kolaylaştırdığı sonucuna varılabilir. Diğer bir taraftan, oda sıcaklığına yakın sıcaklıklardan daha yüksek sıcaklıklar, polimer molekül zincirlerinin hareketliliğini arttırmakta ve bu da α fazının oluşumunu kolaylaştırmaktadır [200]. PVDF'in kristal polimorfları arasında β -fazı, yüksek termal kararlılık, piezoelektrik özellikler ve dielektrik sabiti gibi üstün özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir. β -PVDF oluşumu, banyo sıcaklığının oda sıcaklığına yakın olmasıyla ilişkilidir [200]. Elde edilen sonuçlar, PVDF esaslı iskelelerin çökeltilmesinin, değişen koagülasyon banyosu sıcaklıklarına güçlü bir şekilde bağlı olduğunu ve literatür bulgularıyla tutarlı olduğunu açıkça göstermiştir. Haponska ve arkadaşları [200], faz ayrımı yöntemiyle 20 °C, 40 °C ve 60 °C olmak üzere değişen banyo sıcaklıklarında PVDF esaslı membran üretmiş ve elde ettikleri sonuçlar, β -fazının baskın olduğu membranların 20 °C 'de oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca, kristalizasyon sıcaklığının 20 °C 'nin üzerinde olmasının PVDF'nin α -fazının oluşmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir.

Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen PVDF esaslı iskelelerin termal davranışı DSC kullanılarak belirlenmiştir. İskelelerin ilgili ısıtma ve soğutma eğrileri sırasıyla Şekil 3.6 (a) ve (b)'de gösterilmiş olup, erime, kristalleşme sıcaklıkları ve kristalleşme davranışları Çizelge 3.2'de özetlenmiştir. DSC verileri incelendiğinde, P-5, P0, P10 ve P20 iskelelerinin erime sıcaklığı 167-170 arasında °C iken, iskelelerin soğutulmasıyla kristalizasyon pikinin 146 °C olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi, DSC termogramlarının farklı kristalin fazlara karşılık gelen çoklu erime endotermi sergilediği gözlemlenmiştir. Düşük sıcaklıkta tespit edilen pik α fazıyla ilişkilendirilirken, yüksek sıcaklıkta tespit edilen pik β fazına atfedilmiştir [55]. Bununla birlikte, değişen banyo sıcaklıklarına rağmen iskelelerin toplam kristallliği çok fazla farklılık göstermemiştir. Diğer bir taraftan, PVDF esaslı iskelelerin erime sıcaklıkları insan vücut sıcaklığından önemli ölçüde daha yüksektir, bu da iskeleler vücuda implante edildiğinde mekanik performansının bozulmayacağını gösterebilir [183].

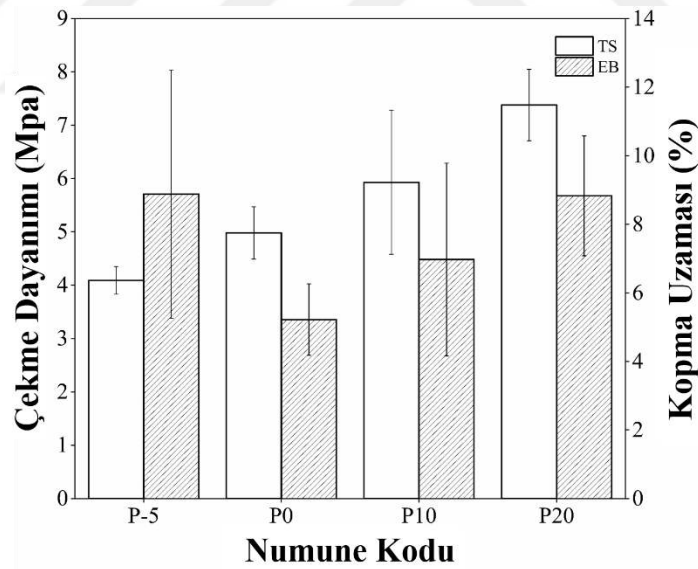


(a)

(b)

Şekil 3.6 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin DSC termogramları: a) birinci ısıtma döngüsü, b) kristalizasyon.

İmplant edilecek iskelelerin mekanik mukavemeti, yerine geçeceği dokunun elastik davranışını taklit etmede ve implantasyon verimliliğini belirlemede hayati bir rol oynamaktadır [183]. Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında hazırlanan PVDF esaslı iskelelerin çekme dayanımı-kopma uzaması değerleri Şekil 3.7'de sunulmuştur.



Şekil 3.7 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin çekme dayanımı - % uzama değerleri.

Şekil 3.7'de görüldüğü gibi, banyo sıcaklığının -5 °C'den 20 °C'ye çıkarılmasıyla çekme mukavemeti $4,09 \pm 0,26$ 'dan $7,38 \pm 0,67$ MPa'ya önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak iskelelerin kopma uzamasında küçük farklılıkların mevcut olduğu görülmüştür. Bu eğilimler, iskelelerin mekanik özelliklerinin koagülasyon banyo sıcaklığının değiştirilmesiyle büyük ölçüde kontrol

edildiğini doğrulamaktadır. Diğer bir taraftan, morfoloji, mikro yapı ve kristallik polimerik membran iskelelerin mekanik özelliklerini etkileyen ana faktörlerdir [176]. Ancak, DSC verilerinin kristalliliğin tüm iskelelerde yaklaşık olarak sabit kaldığını göstermesi nedeniyle mekanik özelliklerdeki değişimin daha çok morfolojik özelliklere bağlı olduğu söylenebilir.

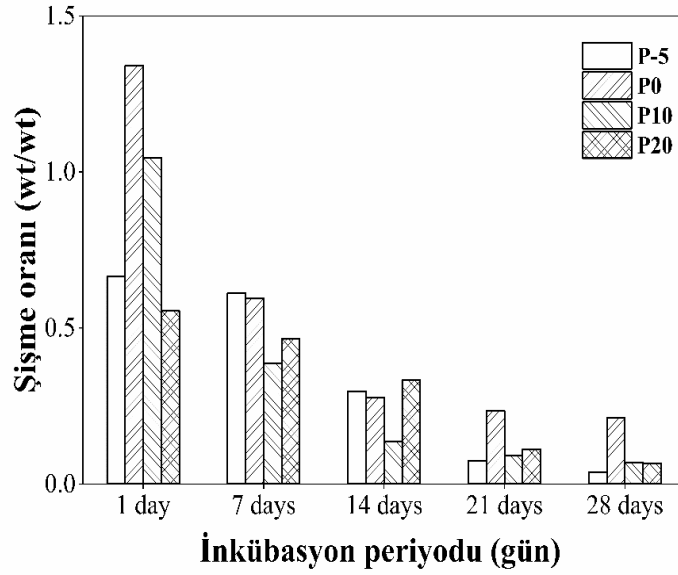
İskelelerin morfolojileri ve gözenek yapıları göz önüne alındığında yüzeydeki yoğun yapı, kesitteki birbirine bağlı gözeneklerle birleşerek iskele yüzey alanını arttırmakta ve mekanik bütünlüğünü korumaktadır. Ayrıca, tekdüze hücresel sünger benzeri kesit morfolojisinin mekanik özellikler üzerinde olumlu bir etkisi vardır [214]. Daha düşük sıcaklıklarda, örneğin -5 °C'de, artan difüzyon hızı daha küçük gözeneklere sahip nodüler/küresel bir yapının oluşumuna yol açar. Bu daha küçük gözenekler, iskele yapısı içindeki artan yoğunluk ve azalan kusurlar nedeniyle daha yüksek çekme dayanımına katkıda bulunur. Sıcaklık 20 °C'ye yükseltildiğinde, gözenek boyutu önemli ölçüde artar. Daha büyük gözenekler genellikle daha fazla boşluk ve kusur ile iskelenin yapısal bütünlüğünü zayıflattıkları için genel çekme dayanımını azaltır. Bu durum, çekme dayanımının -5 °C'de $4,09 \pm 0,26$ MPa'dan 20 °C'de $7,38 \pm 0,67$ MPa'ya çıkmasıyla doğrulanmıştır. Ayrıca, bu sonuç gözenek boyutu artarken yapısal bütünlüğün aynı zamanda gözeneklerin tekdüzeliğine ve bağlantısına da dayandığını göstermektedir. Morfolojideki homojenlik, iskelelerin mekanik özelliklerini belirlemede önemli bir rol oynar. Tekdüze gözenek dağılımı ve tutarlı bir morfoloji, gerilim yoğunlaşma noktalarını en aza indirdiği için daha iyi mekanik performans sağlar. -5 °C'de tamamen nodüler bir yapının oluşumu, daha küçük, eşit dağılmış gözeneklere sahip daha homojen bir morfoloji sağlar. Bu homojenlik, daha yüksek çekme dayanımına katkıda bulunur. Tersine 20 °C'de, iskele yapısı daha büyük gözenekler ve artan gözeneklilikle daha az düzgün hale gelir ve bu durum gözenek dağılımının heterojen yapısı nedeniyle azalan çekme dayanımına yol açar. Daha yüksek sıcaklıklarda daha düzgün hücresel sünger benzeri enine kesit morfolojisi, artan gözenek boyutuna rağmen mekanik özellikleri artırır. Özetle, morfolojideki homojenlik ve düzgün gözenek dağılımı, iskelelerin mekanik özelliklerini önemli ölçüde etkiler. Gözenek boyutunun artması genellikle çekme dayanımını azaltırken, daha yüksek sıcaklıklarda gözeneklerin düzgünlüğü ve bağlantısı, iskelenin mekanik bütünlüğünü iyileştirerek daha yüksek çekme dayanımı değerleriyle sonuçlanır.

Sonuç olarak, NIPS prosesinde yukarıda belirtildiği gibi koagülasyon banyo sıcaklığının ayarlanmasıyla istenilen mekanik özelliklere sahip iskelelerin üretilmesi mümkün olmaktadır. Diğer bir taraftan, çalışmanın bu bölümünde üretilen tüm iskelelerin çekme mukavemetinin insan süngerimsi insan süngerimsi kemiğinin mekanik dayanımına yakın olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, koagülasyon banyo sıcaklığının artırılmasının daha yüksek gerilme ve gerinim değerleri elde edilmesini sağladığı söylenebilir.

3.3.1.3 *In vitro* biyolojik özellikler

İmplant edilen iskelelerin şeklini korumak ve dislokasyonu önlemek için şişme derecesi kontrol edilebilir olmalıdır [215]. Optimum şişme derecesi, hücre infiltrasyonunu kolaylaştırarak tohumlanmış hücre büyümesi ve ortamdan besin emilimi olasılığını arttırmaktadır [216]. Bu nedenle, numunelerin PBS (37°C, pH=7,4) içerisine 28 gün boyunca daldırılmasıyla *in vitro* şişme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.8 incelendiğinde, 24 saatlik inkübasyon sonrası diğerleriyle karşılaştırıldığında en yüksek şişme derecesi 1,34 olarak P0 numunesinde ölçülmüştür. Bununla birlikte, iskelelerin şişme derecesinin koagülasyon banyo sıcaklığına göre önemli ölçüde değiştiği gözlenmiştir. Koagülasyon banyo sıcaklığının artırılması ile üretilen P20 numunesi 0,55 olarak en düşük şişme derecesini göstermiştir. Bununla birlikte, Bölüm 2.3.2.2’de açıklanan şişme sonuçlarına benzer şekilde tüm numunelerin 24 saat içerisinde neredeyse doygunluğa ulaştığı ve şişmenin daha ileri aşamalarında polimer zincirlerinin kırılması nedeniyle şişme eğiliminin genellikle azalmaya başladığı gözlenmiştir. Diğer bir taraftan, şişme davranışı iskelelerin yüzey hidrofiliği ve kristallliği ile yakından ilişkilidir [183]. Şişme deneylerinden elde edilen sonuçlar, Bölüm 3.3.1.1’de verilen temas açısı ölçüm verilerini tamamlayarak yüzey hidrofiliğinin arttığını ve değişen koagülasyon banyo sıcaklıklarında iskelelerin şişme davranışının azaldığını ortaya koymuştur. Bu durum, iskele yüzeyinin suya karşı daha yüksek bir afiniteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu artan hidrofilitate, tipik olarak daha iyi su emilimi ile ilişkilidir. Ancak, şişme davranışı yalnızca yüzey hidrofilitesine bağlı değildir; aynı zamanda iç gözenek yapısı ve polimer matrisinin suyu tutma yeteneğinden de önemli ölçüde etkilenir. P20 numunesi ele alındığında azalan şişme, gözenek yapısı ve yoğunluğu, polimer zincir etkileşimi ve şişme dengesi gibi çeşitli faktörlere atfedilebilir. Koagülasyon banyo sıcaklığı arttıkça, ortaya çıkan gözenek yapısı daha kompakt ve birbirine bağlı hale gelir. Bu durum, yüzey

hidrofilisitesini artırırken, su emilimi için mevcut genel hacmi de sınırlayarak şişme kapasitesini azaltır [217].

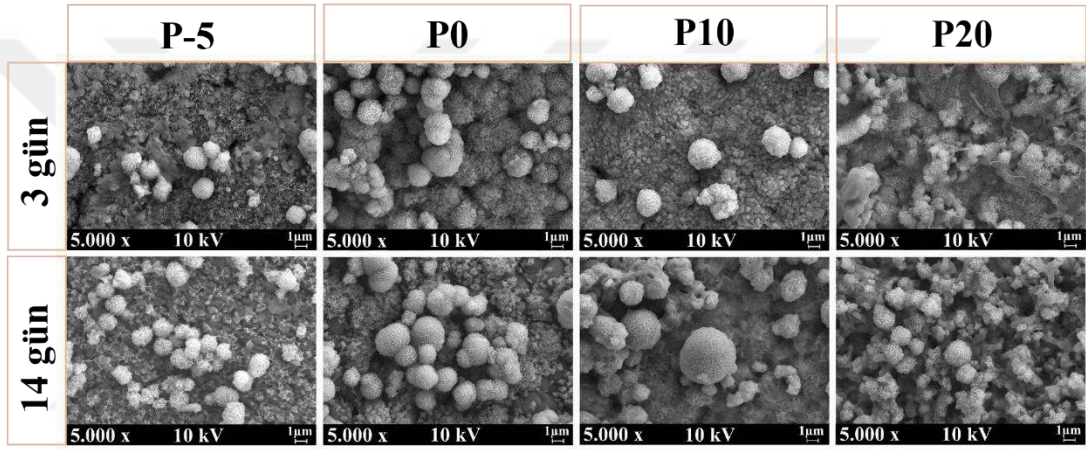


Şekil 3.8 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin şişme değerleri.

Koagülasyon süreci sırasında daha yüksek sıcaklıklar, daha sıkı polimer zincir etkileşimlerine ve iskele içinde artan çapraz bağlama yoğunluğuna yol açabilir. Bu, yüzey daha hidrofilik olmasına rağmen şişmenin kapsamını kısıtlayan daha sert bir yapı ile sonuçlanır [218]. Ayrıca, denge şişme davranışı polimer matris içindeki hidrofilik ve hidrofobik etkileşimler arasındaki dengeden de etkilenir. Yüzey daha hidrofilik olsa bile, genel ağ yapısı bu iç etkileşimler nedeniyle kapsamlı şişmeye karşı koyabilir [219]. Diğer bir taraftan, iskelenin şişme davranışı hücre göçünü ve penetrasyonunu kolaylaştırmada kritik bir rol oynar. Hücre göçü süreci sırasında hücreler, iskele malzemesini yerel olarak parçalamak için Matriks Metalloproteinazları (MMP'ler) salgılayabilir ve göç için daha geniş alanlar yaratabilir [220]. Dahası, hücreler iskelenin önemli bir şekilde parçalanmadan gözeneklerden geçtikleri amip benzeri bir hareket benimseyebilir. Bu şekilde şişme, iskele boyunca hücre göçünü kolaylaştırır, besin ve oksijenin difüzyonunu iyileştirir [221], iskele içindeki hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını destekler ve Bölüm 3.3.1.1'de tartışılan genel gözenek boyutundaki artışı teşvik eder.

Fizyolojik koşullar altında mineralize bir tabakanın oluşumu, doğrudan kemik dokuya bağlanma potansiyeli olan biyoaktiviteyi ifade etmektedir. Biyoaktivite mekanizması, vücut sıvılarıyla temas ettiğinde biyoaktif malzemelerin yüzeyinde mineralize apatit

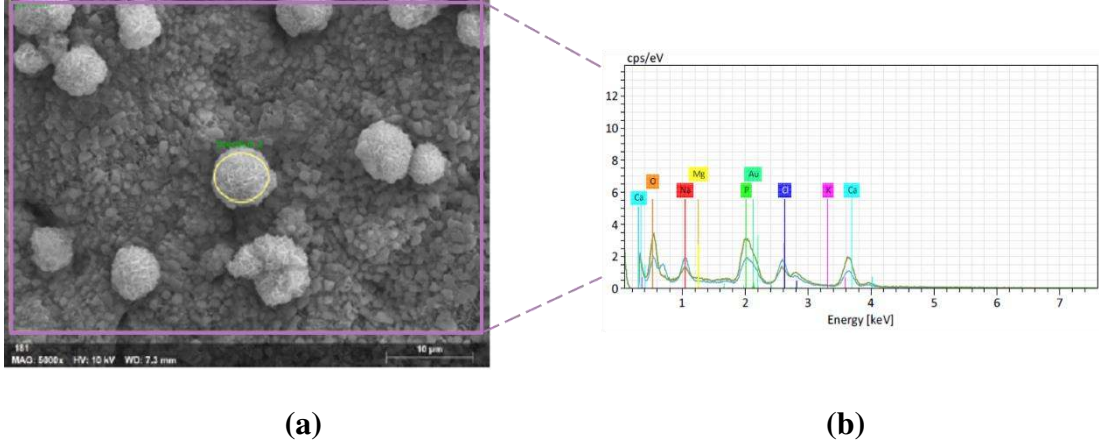
tabakasının oluşması ve bir dizi karmaşık biyolojik reaksiyonla ilerlemesi yoluyla meydana gelmektedir. Bu mekanizma, malzeme-doku arayüzünde iyon değişimi, organik faz birikimi, hücre farklılaşması, bağlanma, çoğalma ve hücre dışı matris oluşumu olarak sıralanabilir [222]. CaP tabakasının oluşumunu hızlandırmak için hazırlanan 10xSBF (37°C, pH=7,4) çözeltisi içerisinde numunelerin 3 ve 14 gün boyunca inkübe edilmesiyle *in vitro* biyoaktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir [30]. İnkübasyon öncesi ve sonrası gerçekleştirilen mikroyapısal çalışmalar, PVDF esaslı numunelerin morfolojilerindeki farklılıkları ortaya çıkarmıştır. Şekil 3.9, 3 ve 14 günlük inkübasyonun ardından numunelerin yüzeyinde oluşan kemik benzeri apatit katmanını göstermektedir.



Şekil 3.9 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağırlık %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyonun ardından SEM görüntüleri.

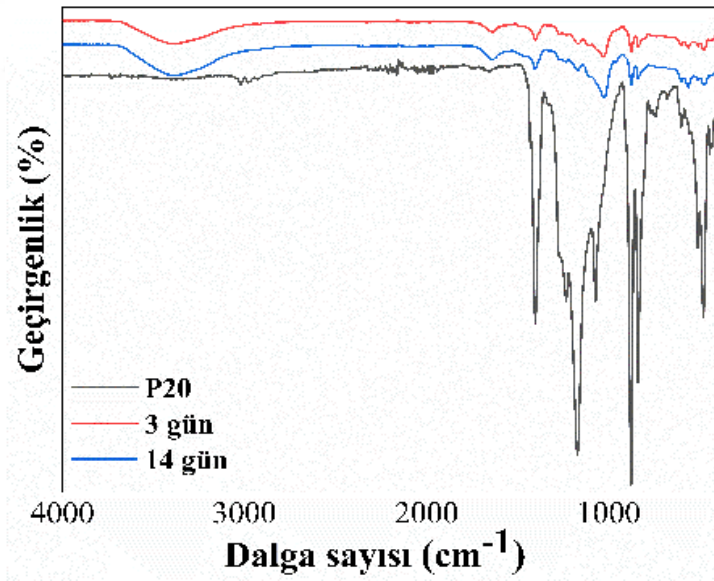
PVDF esaslı numunelerin farklı süreler boyunca SBF'ye daldırılmasından sonra yüzeylerinde önemli değişiklikler meydana gelmiştir. 3 günlük inkübasyonun ardından numunelerde oluşmaya başlayan apatit çekirdeklenmesi ve granüler çekirdekli apatit sayısının zamanla arttığı açıkça görülmektedir. Bu granüler apatitler, benzer çalışmalarda gözlemlendiği gibi fizyolojik sıvılarla temas halindeki biyoaktif yüzeylerde oluşan apatitin karakteristiği olan karnabahar benzeri bir morfoloji sergilemiştir [223,224]. Ayrıca, iskelelerin yüzeyindeki mineralize apatitlerin yoğunluğu, koagülasyon banyo sıcaklığıyla birlikte artmış olup, diğer numunelerle kıyaslandığında P20 numunesinde daha yoğun apatit katmanları gözlenmiştir. Karnabahar benzeri kümelerin kimyasal bileşimi EDS kullanılarak analiz edilmiş ve biyoaktif malzemelerin üzerinde biriken apatitin göstergesi olan Ca ve P elementlerinin varlığı doğrulanmıştır. EDS spektrumları, Ca ve P piklerinin

yoğunluğunun banyo sıcaklığıyla birlikte arttığını doğrulamış; bu da numuneler üzerinde apatit büyümesi olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 3.10 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerinin 14 günlük inkübasyonun ardından a) SEM görüntüsü; (b) (a)'da belirtilen alanın EDS analiz spektrumu.

Üretilen iskelelerin yüzeyindeki apatit oluşumunun daha fazla araştırılması amacıyla FTIR spektroskopisi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.11, seçilen P20 numunesi üzerinde büyütülen apatitin karakteristik FTIR spektrumunu göstermektedir.

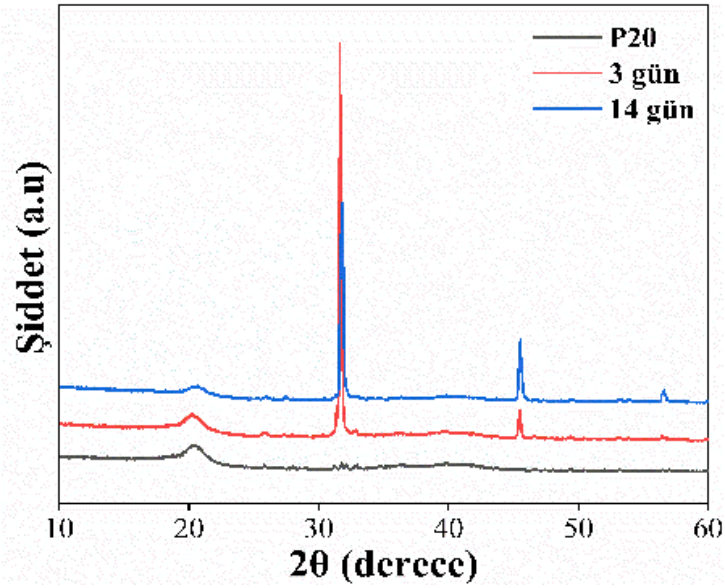


Şekil 3.11 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası FTIR spektrumları.

İnkübasyon öncesi FTIR spektrumuyla karşılaştırıldığında, PVDF, BCP ve bora ait karakteristik piklerin yanı sıra, PO₄³⁻ gruplarının simetrik ve asimetrik gerilme modlarını temsil eden ek bantların ortaya çıktığı gözlenmiştir. 560 cm⁻¹ ve 600 cm⁻¹'de

bulunan iki yeni pik, P-O bükülme titreşimlerine atfedilen apatit veya diğer kalsiyum ortofosfatlarla ilişkilendirilmiştir. Diğer bir taraftan, apatit tabakası üzerinde H₂O tarafından adsorbe edilen O-H titreşimlerinin varlığı, yaklaşık 1650 cm⁻¹'de bir bant ve 3100 cm⁻¹ ile 3600 cm⁻¹ arasında geniş bir bantla gösterilmiştir [225,226].

3 ve 14 günlük inkübasyondan önce ve sonra gerçekleştirilen XRD analizi iskelelerdeki apatit oluşumunu doğrulamıştır. Şekil 3.12, seçilen P20 numunesi üzerinde büyütülen apatitin 3 ve 14 günlük inkübasyon periyotlarından önce ve sonra örtüşen XRD difraktogramlarını göstermektedir.

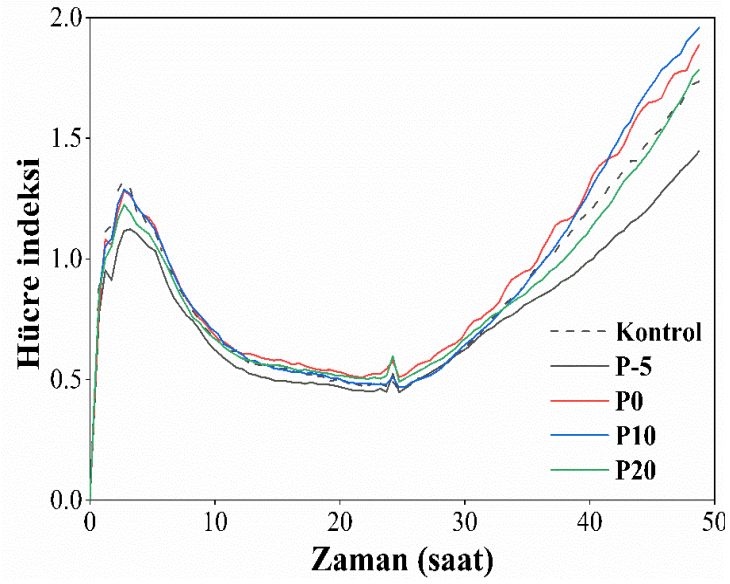


Şekil 3.12 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası XRD difraktogramları.

P20 numunesine ait $2\theta=26^\circ$, 32° , 46° ve 48° 'deki kristal pikler apatit yapısına endekslenmiştir [31]. Kırınım pikleri karşılaştırıldığında, numunenin SBF içerisinde inkübasyonundan sonra piklerin yoğunluğunda bir artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bu pik yoğunluklarının daldırma süresiyle birlikte arttığı da gözlenmiştir. Bu durum, numunenin yüzeyindeki apatit tabakasının büyümesine atfedilebilir [226]. Bununla birlikte, P20 numunesine ait tüm piklerin yoğunluğu 14 günlük inkübasyon periyodunun sonunda daha yüksek olmasına rağmen, 32° 'de gözlemlenen keskin pikin yoğunluğu 3 günlük inkübasyon periyodunda daha yüksektir. İnkübasyonun 3. gününde, malzemenin sergilediği yüksek kristallığın 32° 'de keskin ve yoğun bir pik oluşturmuş olabileceği düşünülmektedir. Diğer bir değişle, malzemenin daha düzenli bir iç yapıda olması ve kristalitlerin iyi oluşmuş olması bu keskin ve yoğun pikin

oluşumuna katkıda bulunmuş olabilir. 14 günlük inkübasyon periyodunun sonunda, kristalit boyutları küçülüp, daha geniş ve daha az yoğun bir pik oluşturmuştur. Bu durumun, zaman geçtikçe artan yaşlanma süreçleri sonucu kristalin alanların kısmi çözünmesi veya yeniden düzenlenmesi nedeniyle oluşmuş olabileceği düşünülmektedir [227]. Malzemenin iç yapısı, düzenli bölgelerden bazılarının düzensiz hale geldiği, genel kristallığı ve dolayısıyla pik yoğunluğunu azaltan bir yeniden düzenlemeye uğrayabilir. Zamanla kusurların veya safsızlıkların oluşması, kristalin yapıyı bozarak pik keskinliğinde ve yoğunluğunda bir azalmaya yol açabilir [228]. Termal dalgalanmalar, nem ve oksidasyon gibi çevresel koşullar ve yaşlanma etkileri gibi malzemeye özgü süreçler bu duruma katkıda bulunur. Örneğin, değişen sıcaklıklara maruz kalma, termal genleşme ve büzölmeye neden olarak kristal yapı içerisinde strese yol açar. Bu durum, kusurlara veya malzemenin genel düzeninde bir azalmaya neden olur. Yüksek nem, pik yoğunluğunu azaltarak kristal yapıya müdahale eder [229]. Havaya uzun süre maruz kalma ise, oksidasyona neden olarak malzemenin kristallığını ve dolayısıyla pik yoğunluğunu etkiler [229]. Zamanla malzemeler fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştiği yaşlanmaya uğrayabilir. Bu yaşlanma, kristalit boyutunda azalmaya veya amorf bölgelerin oluşumuna yol açar [228]. Özetle bu bulgular, membran doku iskelelerinin biyoaktivitesini doğrulamakta ve P20 numunesinin yüzeyindeki apatit büyümesindeki önemli artışın altını çizmektedir. Elde edilen sonuçlar, koagülasyon banyo sıcaklığının arttırılmasının üretilen membran iskelelerinin *in vitro* mineralizasyonunu arttırdığını göstermiştir.

Hücre canlılığı, implante edilebilir iskelelerde biyouyumluluğun değerlendirilmesi için kritik bir parametredir. İskeleler, sitotoksik etki göstermeksizin uygun bir ortam sağlayarak hücrel tepkileri kolaylaştırmalıdır [183]. PVDF esaslı iskelelerin L929 fare fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi, önceden belirlenmiş inkübasyon zaman aralıklarında WST-1 analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Şekil 3.13 ve Çizelge 3.3, iskelelerin 24 ve 48 saatlik hücre maruziyeti dönemleri için sitotoksite analizinin sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 3.13 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin sitotoksikite ve hücre canlılık değerleri.

Elde sonuçlara göre, iskeleler herhangi bir *in vitro* sitotoksik etki sergilemeden arzu edilen hücre canlılığı ve çoğalması göstermiştir. Hücre canlılığının, 24 saat ve 48 saat aralıklarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm numuneler için %80'in üzerinde olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, L929 hücreleri koagülasyon banyo sıcaklığına bağlı olarak değişken tepkiler göstermiştir. Örneğin, 24 saatlik kültürden sonra, P-5 örneğine ekilen hücreler yaklaşık %83 canlılık sergilerken, diğer örneklere ekilen hücrelerin %100'ün üzerinde canlılık gösterdiği tespit edilmiştir. 48 saatlik kültür periyodunun ardından P10 ve P20 numunelerindeki hücre canlılığı, 24 saatlik periyoda göre biraz azalmış olsa da %100'ün üzerindedir. Bu bulgular, hücre canlılığının % 100 olarak kabul edildiği kontrol örneğini aştığını ortaya koymuştur; bu durum, koagülasyon banyo sıcaklığının artmasıyla hücre çoğalmasının arttığını göstermektedir.

Çizelge 3.2 : Farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretilen ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelelerinin hücre indeks değerleri.

Numune Kodu	24 saat (%)	48 saat (%)
P-5	83,4	79,12
P0	108,75	95,26
P10	112,45	100,87
P20	102,74	106,53

Bu gözlemler, biyolojik ortamlarda membran formundaki doku iskelelerinin olağanüstü potansiyelini ortaya koymaktadır. Ancak, biyomedikal uygulamalar için

sunulan bu kompozit membran iskelelerin uzun vadeli etkinliğini belirlemek için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç vardır.

3.4 Sonuçlar

Çalışmanın bu bölümde, kemik doku mühendisliği uygulamaları için ağ. %1 bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskeleleri NIPS ve liyofilizasyon yöntemlerinin kombinasyonu kullanılarak üretilmiştir. Ayrıca, bu yöntemde kritik bir çalışma parametresi olan koagülasyon banyo sıcaklığının iskelelerin fiziksel, mekanik ve biyolojik özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, daha yüksek koagülasyon banyo sıcaklıklarında hazırlanan iskelelerde yoğun bir yüzey tabakasının altında birbirine bağlı gözenekli bir yapının ortaya çıktığını göstermiştir. Koagülasyon banyo sıcaklığındaki artış, iskelelerin yüzey hidrofiliğini arttırırken şişme derecelerini azaltmıştır. İskeleler, arzu edilen termal özellikleri ve yüksek bir β -kristalin faz fraksiyonunu sergilemiştir. Mekanik testler sonuçları, koagülasyon banyo sıcaklığının arttırılmasıyla daha yüksek gerilme ve gerinim değerleri elde edildiğini göstermiştir. Buna ek olarak iskeleler, sitotoksite göstermeden olumlu *in vitro* biyoaktivite, hücre canlılığı ve çoğalma göstermiştir. Bu bağlamda, biyouyumlu kompozit malzemeler için mekanik, termal ve biyolojik özellikler gibi temel gereksinimler, koagülasyon banyosu sıcaklığının değiştirilmesiyle modüle edilebilir. Elde edilen verilere dayanarak, daha ileri çalışmalar için optimize edilmiş koagülasyon banyo sıcaklığı olarak 20 °C seçilmiştir. Sonuçlar, üretilen kompozit membranların kemik rejenerasyonu ve daha geniş kemik doku mühendisliği uygulamaları için biyomalzeme olarak önemli bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur.

4. BOR KATKILI BAĞDADİT (BAG)/POLİVİNİLİDEN FLORÜR (PVDF)/POLİKAPROLAKTON (PCL) ESASLI MEMBRAN İSKELELERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

4.1 Giriş

Diyabet, nörolojik hastalıklar, travma ve çeşitli kanserler sonucu oluşan kemik doku hasarları klinik sorunlara yol açmaktadır. Kemikler, kendini yenileme yeteneğine sahip olan dinamik dokular olmalarına rağmen, bu özellik karmaşık ve büyük defektlerde yetersiz kalabilmektedir [230]. Geleneksel tedavi yöntemlerinin sınırlamaları, doku büyümesini kolaylaştırmak için iskele görevi gören biyomalzemeleri hücrelerle birleştirerek hasarlı dokuları tedavi etmek için umut verici bir yaklaşım olarak kemik doku mühendisliğinin ortaya çıkmasına neden olmuştur [91]. Bu yaklaşımın temel bileşeninden biri olan doku iskeleleri, kemik nakillerine alternatif olarak gündeme gelmiştir [92]. İskelelerin kullanımı, kemik hücreleri için mikro ortam olan yeni bir ECM oluşumu yoluyla hastalıklı bölgeyi yapısal olarak desteklemektedir [31]. Bu yaklaşımın zorluğu, hasarlı dokudaki hücresel mikro çevreyi, malzeme, yapı ve işlev açısından doğal kemiğe benzer özelliklerle değiştirecek olan bu yeni ECM'yi tasarlamaktır [92,231]. Doğal kemik dokunun yüksek mekanik mukavemeti, hidrofilik ve gözenekli yapısı, piezoelektrik özellikleri ve biyouyumluluğu göz önüne alındığında, bu özellikleri karşılayan malzemeler kullanılarak üretilen iskelelerin uygulama şansı daha yüksektir [91,92,230,232].

Son on yılda, belirli özelliklere sahip çok çeşitli biyomalzemeler, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda iskele malzemesi olarak muazzam bir potansiyel göstermiştir [95]. Doğal ve sentetik kaynaklı çeşitli polimerler, kemik doku mühendisliği uygulamalarında ikame olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [92]. Doğal polimerler iyi biyouyumluluk, osteokondüktivite ve düşük immünogenite sergilemektedir. Ancak, kontrol edilmesi zor bir bozunma oranına ve düşük mekanik stabiliteye sahip olmaları kullanımlarını sınırlamaktadır. Doğal polimerlerle karşılaştırıldığında, sentetik polimerler, kontrollü bozunma oranı, çözünür molekülleri iletme potansiyeli, ayarlanabilir mekanik özellikler, uzun raf ömrü ve düşük maliyet gibi birçok avantaja sahiptir [233]. Buna ek olarak, geleneksel polimerlere alternatif

yenilikçi aktif iskeleler için yeni yaklaşımlar bulma konusu, dünya çapında çeşitli araştırma grupları tarafından çalışılmaktadır [232]. Özellikle, bu amaçla yenilikçi piezoelektrik sentetik polimerlerin kullanımı, kemik doku tedavilerini bir sonraki adıma taşımıştır [234]. Piezoelektrik polimerler, harici bir güç kaynağının yokluğunda elektriksel uyarıların doğrudan iletilmesine izin veren elektroaktif malzemelerdir [232,235]. Bu elektriksel çıktı, cilt, kalp ve sinir dokusu gibi yumuşak doku uygulamaları için uygun bir rejeneratif mikro ortamı destekleyebilir [232]. Bu nedenle, bu özelliklerin iskelelere dahil edilmesi, aktif biyoiskelelerin üretilmesine olanak tanır. Piezoelektrik polimerler arasında farklı kristalin fazlara sahip yarı kristalin bir polimer olan PVDF'in β -fazı, birim hücre başına 8×10^{-30} Cm'lik en yüksek dipolar moment ile en yüksek piezo-piroelektrik özelliklere sahiptir [95,236]. Bununla birlikte, mevcut PVDF esaslı iskelelerin çoğu tek başına ideal biyolojik olarak parçalanabilirlik, fizyolojik olarak esneklik, hücre etkileşimini desteklemek için hidrofilitate ve yarı geçirgenlik gibi tüm önemli özellikleri sağlayamamaktadır [92,209]. Polimerleri karıştırma (blending), başarılı biyolojik uygulamaların gereksinimlerini karşılayan işlevsel malzemeler geliştirmek için elverişli bir yaklaşımdır [95]. Önceki araştırmalar, PVDF esaslı iskelelerin başka polimerlerle karıştırılmasının, istenen özelliklere sahip yeni malzemelerin üretilmesine olanak tanıdığını göstermiştir [231]. Polikaprolakton (PCL), yüksek biyouyumluluğu, uygun mekanik özellikleri, termal kararlılığı, toksik olmayan bozunma ürünleri ve yavaş bozunma hızı nedeniyle PVDF ile karışım için iyi bir seçimdir [92,236]. PCL, kolay bulunabilirliği, maliyet etkinliği ve modifikasyona uygunluğu ile kemik iyileşme sürecini kolaylaştıran yenilikçi iskelelerin geliştirilmesine yönelik yoğun araştırmaların konusudur [95]. Bununla birlikte, zayıf kemikle bağlama yeteneği, yavaş bozunma kinetiği ve osteoindüktivite eksikliği polimerik malzemelerin daha geniş uygulamalarını sınırlar. Biyoseramiklerin polimer matrise dahil edilmesi, polimerlerin özelliklerini artırabilecek etkili bir yaklaşımdır [133,237]. En yaygın kullanılan kalsiyum fosfatlar olan HA ve β -TCP potansiyel adaylar olmasına rağmen, bu malzemelerdeki önemli bir dezavantaj, yük taşıyan uygulamalarda kemik analogu olarak yeterli mekanik mukavemete sahip olmamalarıdır. Önceki çalışmalar, sinterlenmiş HA'nın implantasyondan sonra tam olarak biyobozunur olmadığını ve β -TCP'nin bozunma kinetiğinin yavaş olma eğiliminde olduğunu bildirmiştir [238]. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, kalsiyum fosfatlara alternatif olarak kalsiyum silikat esaslı biyoseramikler araştırılmaktadır [30]. Kalsiyum silikatlardaki silanol grupları (Si-O-H), doku

yenilenmesini destekler [94]. Ayrıca, üçüncü bir bileşenin kalsiyum silikatların yapısına dahil edilmesiyle bu seramiklerin kimyasal kararlılıkları, biyoaktiviteleri ve mekanik özellikleri iyileştirilebilir [38]. Zr, biyouyumlu yapısı ve uygun mekanik mukavemeti nedeniyle kalsiyum silikatlara dahil edilen bileşenlerden biri olup, Ca iyonlarını iyonik olarak bağlayan bir ağ oluşturma potansiyeline sahiptir [30,31]. Bağdadit (BAG, $\text{Ca}_3\text{ZrSi}_2\text{O}_9$), kemik rejenerasyonunda önemli roller oynayan Ca, Si ve Zr iyonlarının varlığı nedeniyle büyük ilgi görmüştür [239]. Bu iyonların serbest bırakılması ve ardından seramiklerin bozunması, mükemmel biyoaktivite, emilebilirlik, osteoblast hücrelerinin *in vitro* farklılaşması ve çoğalması gibi daha yüksek biyolojik performansla sonuçlanır [130,134,239]. Diğer bir taraftan, borun bu iskelelere dahil edilmesi, osteoblast hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını sağlayarak hücre yapışmasını olumlu etkileyebilir. Uygun malzemelerin ve üretim yönteminin kullanılması, iskelelerin stabilitesini ve işlevselliğini artırarak kemik dokusu rejenerasyonuna katkıda bulunabilir.

Çalışmanın bu bölümünde, farklı oranlarda bor katkılı BAG tozları sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Daha sonra, sentezlenen tozlar PVDF ve PVDF-PCL çözeltilerine dahil edilerek NIPS tekniğiyle membran formunda kompozit iskeleler üretilmiştir. Sentezlenen tozların üretilen iskelelerin özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmış ve iskelelerin morfolojik ve yüzey özellikleri SEM ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. İskelelerin termal özellikleri DSC ile belirlenirken, β -kristalizasyon oranı FTIR ile hesaplanmış ve β -faz yapısı X-ışını kırınımı (XRD) ile karakterize edilmiştir. İskelelerin mekanik özellikleri ise, çekme dayanımı ölçümleri ile tespit edilmiştir. İskelelerin *in vitro* biyolojik özellikleri SBF içerisinde biyoaktivite deneyi ve şişme oranı ölçülerek değerlendirilmiştir. İskelelerin sitotoksitesi, hücre canlılığı ve hücre yapışması *in vitro* hücre kültürü deneyleri yapılarak daha detaylı araştırılmıştır.

4.2 Deneysel Çalışmalar

4.2.1 Malzemeler

BAG tozlarının sentezi için tetraetil ortosilikat ($\text{Si}[\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]_4$; TEOS), zirkonyum (IV) oksinatrat hidrat ($\text{ZrO}[\text{NO}_3]_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; Zr-nitrat) ve kalsiyum nitrat tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Ca-nitrat) Alfa AesarTM (ABD) firmasından satın alınmıştır. Kullanılan nitrik asit (HNO_3) MerckTM (Almanya) temin edilmiştir. Katkılı BAG

tozlarının sentezi için bor kaynağı olarak borik asit (H_3BO_3) MerckTM (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Membran doku iskelesi üretiminde kullanılan PVDF Solvay (Solef® 1015) ve PCL (ortalama MW 80.000 Da) firmasından temin edilmiştir. *N, N*-Dimetilformamid (DMF, %99,8) Fisher (ABD) Firmasından satın alınmıştır. Çözücü olarak distile su (DI) ve çözücü olmayan madde olarak DMF koagülasyon banyosunda kullanılmıştır. Üretilen membran doku iskelelerinin biyoaktivite çalışmalarında kullanılmak üzere sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), magnezyum klorür heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) MerckTM (Almanya) firmasından ve sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) Sigma-AldrichTM (Almanya) firmasından satın alınmıştır. İskelelerin şişme çalışmalarında kullanılan fosfat tampon çözeltisi (DPBS, pH 7.4), GibcoTM (ABD) firmasından temin edilmiştir. İskelelerin şişme çalışmalarında kullanılan fosfat tampon çözeltisi (DPBS, pH 7.4), GibcoTM (ABD) firmasından temin edilmiştir. İskelelerin in vitro hücre kültürü testlerinde kullanılan Dulbecco'nun modifiye edilmiş ortamı (DMEM), fetal sığır serumu (FBS) ve Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) PAN Biotech (Almanya) firmasından, MTT, DMSO ve DAPI ise Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

4.2.2 Bor katkılı BAG tozlarının sentezi

BAG tozları, sol-jel yöntemi ile sentezlenmiştir. Öncelikle, TEOS, etanol ve HNO_3 , TEOS: etanol: HNO_3 (2M) = 1:8:0,16 mol oranına sahip olacak şekilde 30 dk boyunca karıştırılmıştır. Hidrolizden sonra, Zr-nitrat ve Ca-nitrat, Zr-nitrat: Ca-nitrat: TEOS = 1:3:2 mol oranına sahip olacak şekilde ilk çözeltiliye eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra, ıslak bir sol elde etmek için çözelti 24 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta bekletilmiş ve kuru bir jel elde etmek için 48 saat boyunca 100 °C sıcaklıkta kurutulmuştur. Bor katkılı bağdadit tozlarının sentezi ise, yukarıda açıklananlara benzer adımlarla gerçekleştirilmiştir. Çözeltiye bor kaynağı olarak H_3BO_3 ağı. %0.5, 1 ve 2 olacak şekilde eklenmiştir. Sol-jel yönteminin ardından kurutulan saf ve bor katkılı tozlar, kamara tipi bir laboratuvar fırınında (ProthermTM PLF 160/7) 1200 °C'de hava atmosferinde 3 saat süreyle ısıtılma tabii tutulmuştur. Deneylerde seçilen ısıtma/soğutma hızı 5 °C/dk'dır. Sentezlenen tozlar, akik havan ve havan tokmağı kullanılarak öğütülmüş ve membran doku iskelelerinin üretimi için hazır hale getirilmiştir. Sentezlenen bor katkısı içeriğine bağlı olarak tozlar sırasıyla BAG, BAG/0.5B, BAG/1B ve BAG/2B olarak adlandırılmıştır.

4.2.3 Bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin üretimi

Sentezlenen tozlar PVDF'e katkılanarak beş farklı membran doku iskelesi NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleri ile üretilmiştir. Kompozit çözeltilerin her biri, toplam katı madde konsantrasyonu ağırlık %18'de sabit tutularak 10'ar mL olarak hazırlanmıştır. Öncelikle, PVDF'in DMF içerisinde bir manyetik karıştırıcıda 60 °C'de 24 saat boyunca karıştırılmasıyla homojen bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözelti içerisinde sentezlenen BAG tozları, PVDF'in ağırlık %10'u oranında eklenmiştir. Hazırlanan çözelti, homojen bir karışım elde etmek amacıyla dökümden önce 10 dk boyunca sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, bir cam altlık üzerine 200 mikronluk film olarak dökülmüş ve ardından hacimce %60:40 oranında DMF ve su içeren koagülasyon banyosuna önceki bölümde optimize edilmiş sıcaklık olan 20 °C'de 3 saat süreyle daldırılmıştır. Elde edilen membranlar, kalan çözücünün uzaklaştırılması için 48 saat boyunca saf su banyosunda durulanmış ve -80 °C'de 4 saat boyunca bir liyofilizatörde (ToroTM TRS-2/2V) liyofilize edilmiştir. Polimer matristeki toz içeriğine bağlı olarak iskeleler sırasıyla PVDF, P/BAG, P/BAG/0.5B, P/BAG/1B ve P/BAG/2B olarak adlandırılmıştır. Ön denemeler sonucu seçilen ağırlık %1 bor katkısı ile PVDF-PCL (70:30) esaslı iskeleler de üretilmiş olup, PVDF/PCL, P/PCL/BAG, P/PCL/BAG/1B olarak adlandırılmıştır. Hazırlanan kompozit membran doku iskelelerinin kimyasal kompozisyonları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : Üretilen farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı kompozit membran doku iskelelerinin döküm çözeltisi bileşimleri.

Numune Kodu	Çözelti bileşimleri		
	PVDF (% ağırlık)	PCL (% ağırlık)	Bor katkılı BAG (% ağırlık)
PVDF	18	-	-
P/BAG	16,2	-	1,8
P/BAG/0.5B	16,2	-	1,8
P/BAG/1B	16,2	-	1,8
P/BAG/2B	16,2	-	1,8
PVDF/PCL	11,34	4,86	-
P/PCL/BAG	11,34	4,86	1,8
P/PCL/BAG/1B	11,34	4,86	1,8

4.2.4 Karakterizasyon

4.2.4.1 Bor katkılı BAG tozlarının karakterizasyonu

Sentezlenen tozların morfolojik karakterizasyonu, bir alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM, Carl Zeiss™/Gemini 300) kullanılarak 15 kV hızlanma voltajında numuneler analizden önce ince bir altın-paladyum tabakası ile kaplandıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen tozların partikül boyut ölçümleri, bir partikül boyutu analizörü (Malvern™ Mastersizer 3000E) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tozların yoğunlukları, bir gaz piknometresi (Micromeritics™, AccuPyc II 1340) kullanılarak ölçülmüştür.

Sentezlenen tozların kristal fazlarının varlığı, Bragg-Brentano gonyometresine sahip bir X-ışınları difraktometresi (XRD, Bruker™ AXS-Discovery D8) kullanılarak monokromatik Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) radyasyonu ile Lynxeye XE dedektörü kullanılarak 40 kV potansiyel fark, 40 mA akım, 20°–60° tarama aralığı koşullarında tespit edilmiştir. Mevcut kristalin fazlar, Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi (The International Centre for Diffraction Data®; ICDD) toz kırınım veri tabanı kullanılarak tanımlanmıştır.

4.2.4.2 Bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin karakterizasyonu

Farklı bor katkı oranlarına sahip BAG/PVDF esaslı iskelelerin yüzey ve kesit morfolojileri, numunelere vakum altında 5 ve 10 kV'luk değişen bir hızlanma voltajı uygulanarak bir alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM, Carl Zeiss™/Gemini 300) ile analiz edilmiştir. Numuneler, analizden önce ince bir altın-paladyum tabakası ile kaplanmıştır. Kesit görüntüleri elde etmek için, numuneler sıvı azotta kırıldıktan sonra kaplama yapılmıştır. İskelelerin gözenek boyut ölçümleri, SEM görüntüleri kullanılarak Image J 1.520 yazılımı ile en az yüz gözenekten ortalama gözenek boyutu olarak hesaplanmıştır.

İskelelerin yüzey özellikleri, temas açısı ölçümleri yapılarak belirlenmiştir. Numunelerin yüzeylerinin statik temas açısını belirlemek için bir temas açısı gonyometresi (Biolin Scientific™/Attension Theta Flex) kullanılmıştır. Analiz, ortam sıcaklığında sabit damla yaklaşımıyla Bölüm 2.3.2.2'de optimize edilen PBS

kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her numune en az üç pozisyonda test edilmiş, ortalama değer ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

İskelelerin kristal faz yapısı, 10–55° tarama aralığında, 40 kV potansiyel fark, 40 mA akım, Cu-K α radyasyonu (1,5406 Å) ile bir X-ışını difraktometresi (XRD, Bruker™ AXS-Discovery D8) kullanılarak belirlenmiştir. Kristalin fazlar, Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi® (ICDD) veri tabanı kullanılarak tanımlanmıştır.

İskelelerin kimyasal yapıları ve etkileşimleri, bir fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi (Thermo Nicolet, iS50) kullanılarak, 400–4000 cm⁻¹ frekans aralığındaki absorban değerlerinin ölçülmesiyle, 14 cm⁻¹ çözünürlükte ve 16 tarama ile analiz edilmiştir. İskelelerin bağıl β fazı içeriği F_β ise, Denklem 2.3'e göre hesaplanmıştır.

İskelelerin termal davranışı ve toplam kristalinitesi diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC, TA Instrument/DSC25) kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler, alüminyum pen içerisindeki 7-8 mg numunenin -90 °C'den 200 °C'ye ısıtılması ve 10 °C/dakika ısıtma hızı -90 °C'ye soğutulması ile azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Erime ve kristalleşme sıcaklıkları sırasıyla ısıtma ve soğutma eğrilerinin pik noktalarından belirlenmiştir. Erime entalpisi, ilk ısıtma eğrisinin 120 ila 170 °C arasındaki sıcaklıklardan entegre edilerek belirlenmiştir. Numunelerin toplam kristallliği X_C , Denklem 2.2 kullanılarak DSC termogramlarından hesaplanmıştır.

İskelelerin mekanik özellikleri, 50 mm/dk sabit hızla 1 kN yük hücresine sahip bir statik mekanik test cihazı (Shimadzu™ AGS X) kullanılarak ölçülmüştür. En az beş numune test edilmiş ve ortalama çekme dayanımı verileri standart sapmayla hesaplanmıştır.

İskelelerin *in vitro* şişme davranışı, Bölüm 2.3.2.2 ve 3.3.1.3'te açıklandığı gibi gravimetrik yöntemle incelenmiştir. Öncelikle, numuneler eşit boyutunda kesilerek kuru ağırlıkları tartılmıştır. Daha sonra, numuneler PBS çözeltisine daldırılmış ve 1, 7, 14, 21 ve 28 günlük inkübasyon sürelerinin sonunda bulundukları sıvıdan alınmıştır. Yüzeydeki sıvı hafifçe silinen numuneler, tartılmış ve şişme dereceleri Denklem 2.1'e göre hesaplanmıştır.

İskelelerin *in vitro* biyoaktivite deneyleri, Bölüm 2.3.2.4 ve 3.3.1.3'te açıklandığı gibi 10xSBF çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2.2'de listelenen reaktifler, sırasıyla 900 mL ultra saf su içerisinde çözölmüş ve hacim, ultra saf su ile 1000 mL'ye

tamamlanarak bir stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 100 mL kapaklı cam şişe içerisine alınarak konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde NaHCO₃ ilave edilerek pH değerinin 7,4 olması sağlanmıştır. Numunelerin 10xSBF çözeltisine daldırılıp 3 ve 14 günlük inkübe edilmesinden sonra, numuneler çözelti içerisinden çıkartılarak durulanmış ve -20 °C’de dondurulduktan sonra -80 °C’de liyofilizatörde 4 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Numunelerin yüzey morfolojisi SEM kullanılarak görüntülenmiş ve yüzeylerde oluşan kemik benzeri apatitin Ca/P oranları EDS ile karakterize edilmiştir. Ayrıca, mineralize CaP tabakasının kimyasal bağları FTIR ile karakterize edilirken, yüzeydeki CaP oluşumu XRD ile araştırılmıştır.

İskelelerin *in vitro* hücre canlılığı ve sitotoksikite değerlendirmesi, Bölüm 2.3.2.4 ve 3.3.1.3’te açıklandığı gibi ISO-10993-5 test protokolüne göre belirlenmiştir. Ancak, önceki bölümlerde kullanılan hücrelerden farklı olarak aderent (yapışık) hücre hattı olan HOB ve MTT testi, bu bölümdeki biyouyumluluk testlerinde kullanılmıştır. Öncelikle, dondurulmuş hücreler -196 °C’deki sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra 37 °C su banyosunda çözölmüştür. Çözölen hücreler, önceden 37 °C’ye ısıtılmış 10 mL taze besiyerine aktarılmış ve 2000 rpm de 5 dk 4 °C santriföjlenerek çöktürölmüştür. İçerisindeki hücre için toksik olan dimetil sülfoksit (DMSO) uzaklaştırıldıktan sonra hücreler, önceden 37 °C’ye ısıtılmış bir hücre költür ortamı olan 5 mL besiyerini içeren T75 cm² hücre költür kabına (flask) aktarılmıştır. Hücreler flask yüzeyine yapışıp yeterli çoğunluğa ulaştıktan sonra (%70 yoğunluk), deney için gerekli hücre sayısı elde edilinceye kadar %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde 10 mL besiyeri içerisinde çoğaltılarak pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin pasajlanması, 10 mL besiyerinin çekilmesinin ardından hücrelerin 5 mL PBS ile yıkanarak serum kalıntıları, metabolitler ve ölü hücrelerden uzaklaştırılması ile devam etmiştir. Bu işlemin amacı, besiyeri içerisindeki serumun tripsin enzim aktivitesini inhibe etmesini önlemektir. Ardından, hücreler 2 mL tripsin ile 3 dk boyunca inkübe edilerek hücrelerin adezyonunu yüzeyden kaldırıp süspanse hale getirmek için bloke edilmiştir. Adezyon blokasyonunun ardından 5 mL taze besi yeri eklenerek tripsin inaktifleştirilmiş ve 2000 rpmde 5 dakika santriföjlenerek hücreler çöktürölmüştür. Daha sonra, tripsinli üst faz uzaklaştırılmış ve hücre peleti 1 mL besi yeri solüsyonu içerisinde çözölerek 10 mL taze besiyeri bulunan yeni bir flaska aktarılıp tekrar %70 doyoğunluğa ulaşana kadar inkübatörde bekletilmiştir. Pasaj dilüsyonu adı verilen seyreltme işlemi, arzu edilen hücre sayısına ve hücrelerin büyüme hızına bağılı olarak

1:2 veya 1:10 olarak belirlenmiştir. Deneylerde kullanılacak hücreler sayılarak istenen miktarları hesaplanmış ve deney plakalarına aktarılmıştır. Hücrelerin sayımı ve canlılığının analizi, hücre süspansiyonunun önceden hazırlanan %4 tripan mavisi ve PBS çözeltisiyle 1:1 oranında karıştırılmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Ölü hücrelerin membran bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak tripan mavisi ile maviye boyandığı bilinmektedir. Bu nedenle, maviye boyanan hücreler hemositometre ile sayım esnasında göz ardı edilmiştir. Sayımı tamamlanan hücreler, 96 kuyucuklu steril plakalarda kuyucuk başına 5×10^4 hücre olacak şekilde 100 μ L DMEM steril besiyeri (%10 Fetal Dana Serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin) ile tamamlandıktan sonra damlalar halinde ekilerek hücrelerin plakaların tabanına yapışması için 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde inkübe edilmiştir. Plakalara ekimi yapılan hücreler, 24 saatin sonunda sterilizasyonu yapılmış ve ekstrakte edilmiş numunelerin konsantrasyonları sırasıyla kontrol (%0), %25, %50, %75 ve %100 olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu gözlemlemek için 24, 48 ve 72 saat daha inkübe edilmiştir. Daha sonra numuneler, 10993-12 test protokülüne uygun olarak UV ile sterilize edildikten sonra özütleme için tam DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri içerisinde bekletilmiş ve besiyeri bu haliyle %100 özüt olarak tanımlanmıştır.

MTT yöntemi, [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] formazana indirgenen MTT miktarı ile meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak ölçülmesi ile canlı hücre sayısının saptanmasında kullanılır. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği, hücre canlılığının ölçütü olarak alınır. MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu, canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir. Deney kapsamında, HOB hücreleri, %10'luk FBS (Fetal dana serumu) ve %2 L-glutamin ile desteklenmiş DMEM besiyerinde çoğaltılarak %5 CO₂ içeren etüvde 37°C ve %90 nemde inkübe edilmiştir. HOB hücre hattı talimatlarına göre, hücrelerin parçalanması işlemi olan tripsinazyon için %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı kullanılmıştır. Hücreler, kültür ortamı içerisinde süspanse edilerek 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde 100 μ L besiyeri içerisinde aktarılmış ve deney öncesi yüzeye tutunmaları beklenmiştir. Ardından kuyucuklardaki hücrelerin üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı

konsantrasyonlardaki numune ekstraksiyonları (%25, %50, %75, %100) ile inkübe edilmiştir. Kontrol olarak sadece tam besiyeri içerisinde kültürlenmiş hücreler (%0 konsantrasyonda) kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, ekstraksiyon ortamı çıkarılmış ve her bir kuyucuğa 4 saatlik bir inkübasyon için PBS'de 5,0 mg mL⁻¹ MTT solüsyonundan 110 µL eklenmiştir. Daha sonra, formazan kristallerini çözmek için kuyucuklara 100 µL DMSO eklenmiş ve absorbans 570 nm'de ölçülmüştür.

Hücresel yapışma çalışmaları, floresan mikroskopisi ve SEM incelemeleri ile gerçekleştirmiştir. Hücreler, MTT protokolünde olduğu gibi 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına kuyucuk başı 1x10⁵ olacak şekilde ekilmiş ve 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından besiyeri çekilmiş ve numuneler, PBS ile yıkanarak %2,5 gluteraldehit çözeltisinde 20 dakika boyunca fiksasyon işlemine tabi tutularak sabitlenmiştir. Genellikle sabitlenmiş hücreleri boyamak için kullanılan, geçirgen olmayan ve yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında canlı hücelere girebilen DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) boyası, floresan mikroskopi incelemesinde görüntülenecek numuneleri boyamak için kullanılmıştır. Daha sonra, boyanan numuneler PBS ile yıkanmış ve artan boya etanol (%70, %80, %90 ve %100) ile dehidrate edilerek konfokal floresan mikroskobu (Leica) ile görselleri alınmıştır. SEM görüntülemeleri için hazırlanan numuneler ise, fiksasyon işleminden sonra dehidrate edilmiştir.

Çalışmanın bu bölümünde seçilen ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF esaslı iskeleye PCL polimeri de dahil edilmiş, morfolojik analiz, *in vitro* biyoaktivite ve hücresel aktivite deneyleri ile özelliklerinin daha da araştırılması hedeflenmiştir. Üretilen PVDF, P/PCL, P/PCL/BAG, P/PCL/BAG/1B kodlu numunelerin sitotoksosite analizlerinin yanı sıra, hücre adezyon deneyleri gerçekleştirilmiş ve alkalen fosfataz (ALP) aktiviteleri belirlenmiştir. Alkalen fosfataz aktivitesinin belirlenmesi için, hücre adezyon deneyindeki gibi önceden steril edilmiş ve besi yeri ile doyurulmuş numunelerin üzerine 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında kuyucuk başına 5x10⁵ hücre ekilmiş ve 14 gün boyunca numuneler ile kültürlemiştir. Daha sonra süpernatant toplanmış ve ALP ELISA Kiti (Fine Test, Çin Halk Cumhuriyeti) ile kitin protokolüne göre inkübasyon ve yıkama sürelerinin ardından 450 nm'de optik yoğunluk ölçümü ile hesaplama yapılmıştır.

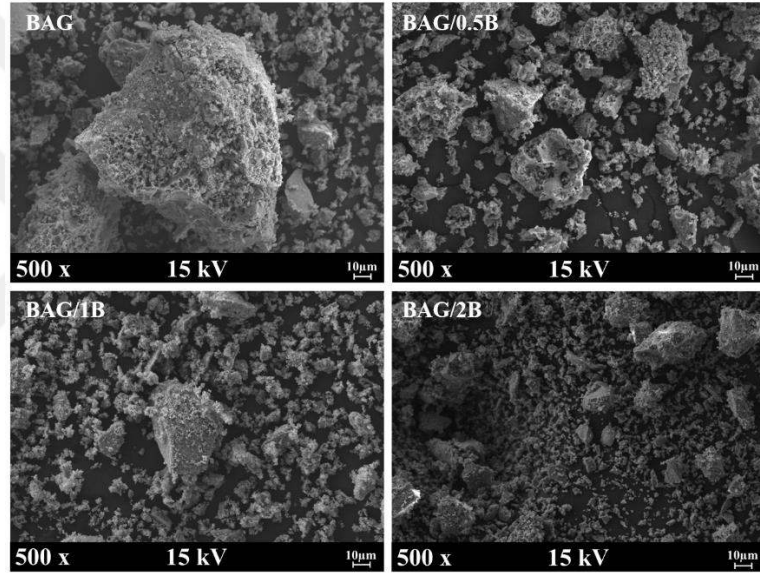
Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve kantitatif veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) raporlanmıştır. İskelelerin şişme oranı, gözeneklilik ve çekme dayanımı verilerinin

istatistiksel analizlerini gerçekleştirmek için Microsoft Excel ve Origin yazılımı (Origin Lab) kullanılmıştır. Hücre kültürü deneyleri için deney grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık, GraphPad Prism 9 programı ile Kruskal-Wallis non-parametrik testi uygulanarak araştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar P değeri <0,05 olacak şekilde uygulanmıştır.

4.3 Bulgular ve Tartışma

4.3.1 Bor katkılı BAG tozlarının karakterizasyonu

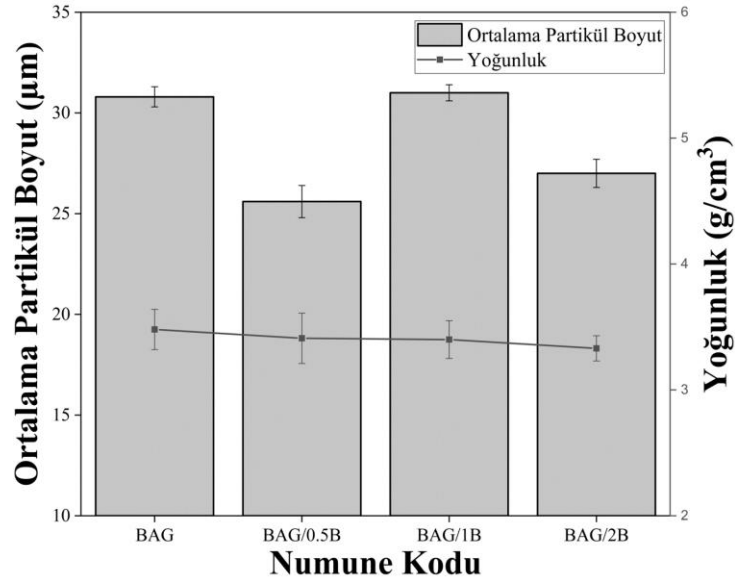
Sol-jel ve ardından 1200 °C’de sentezlenen bor katkılı BAG tozlarının SEM görüntüleri, Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 : Sol-jel ve ısıtma işlemiyle sentezlenen BAG tozlarına ait SEM görüntüleri.

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, BAG tozları homojen olarak dağılmış çok sayıda düzensiz şekilli aglomera içermektedir. Bu aglomeralar, önceki çalışmalarda raporlandığı gibi [98,240], BAG tozundaki yarı küresel kristalitlerin sinterlenmesinin bir sonucu olarak oluşur.

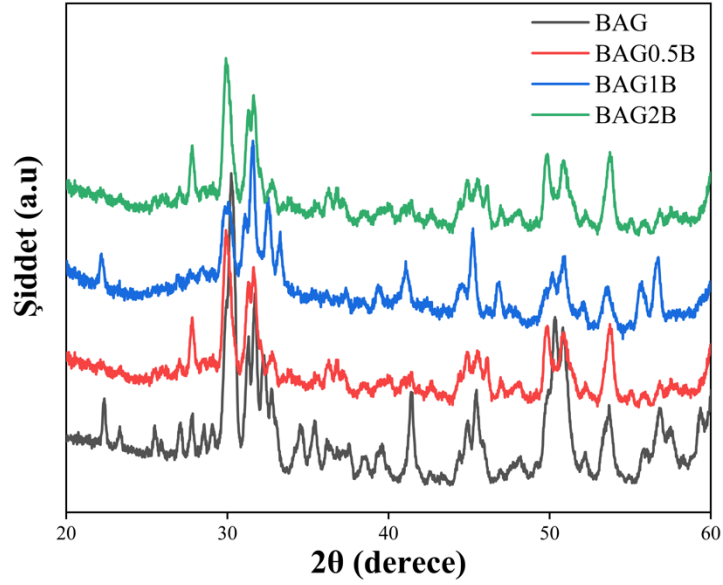
Oluşan mikropartikül aglomeraların parçacık boyutu, lazer kırınımı prensibiyle çalışan bir parçacık boyutu analizörü ile belirlenmiş ve Şekil 4.2’de sunulmuştur. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, ağırlık %0, 0,5, 1 ve 2 bor içeren BAG tozlarının ortalama parçacık boyutunun, önceki bulgularla tutarlı olarak 27 ile 31 µm arasında değişmektedir [240]. Değişen bor içeriği ile tozların partikül boyut ve morfolojisinde belirgin bir değişiklik olmamıştır.



Şekil 4.2 : Sol-jel ve ısıtma işlemi ikili yöntemleri ile sentezlenen BAG tozlarına ait ortalama partikül boyut ve yoğunluk değerleri.

Ağ. %0, 0,5, 1 ve 2 bor katkılı BAG tozlarının piknometre yoğunlukları Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Ağ. %2 bor eklenmesi, BAG tozlarının yoğunluğunu 3,48 g/cm³’ten 3,33 g/cm³’e düşürmüştür.

BAG’ın oluşum mekanizması, TEOS (Si[C₂H₅O]₄) ile dört C₂H₅ molekülü arasındaki oluşan kovalent bağ ile Ca-nitrat ve Zr-nitrat molekülleri arasındaki iyon değişimine dayanmaktadır. TEOS yapısındaki C₂H₅ molekülü çözünür ve TEOS, Zr⁴⁺ ve Ca²⁺’dan altı elektron alır. Daha sonra, her bir SiO₄ molekülü, Si molekülleri arasında oluşan oksijen bağından oksijeni alarak Zr⁴⁺ ile dört elektron ve Ca²⁺ ile iki elektron alışverişinde bulunur. Böylece, kalan dört elektron, Zr⁴⁺ ve Si₂O₇ molekülleri arasında bir çekim oluştur ve bağdadit fazının oluşumu gerçekleşir [94]. Bu fazın oluşumunu doğrulamak için XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3, sol-jel ve 1200 °C’de sinterleme ikili yöntemleri ile sentezlenen bağdadit tozuna ait XRD difraktogramını göstermektedir. Ağ. %0, %0,5, %1 ve %2 ağırlık oranında bor içeren tozlara ait XRD pikleri, bağdadit oluşumunu doğrulamaktadır. 2θ = 31,38° ve 29,85°’teki ana kırınım pikleri ayırt edilebilir olup, BAG fazının en yüksek yoğunlukta piklerine karşılık gelir (PDF kart no: 00-047-1854). Bu pikler, (032) ve (202) düzlemlerine endekslenmiştir. Sonuçlar, ana piklerin, numunelerin birincil bileşeni olan BAG kristalinin kırınım desenine uyduğunu göstermiştir. BAG fazının yoğun piklerinin varlığına rağmen, ikincil faz olarak larnit fazının varlığın da belirgin olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, TEOS hidrolizindeki Zr öncüsünün tamamen çözünmemiş olması olabilir [240].

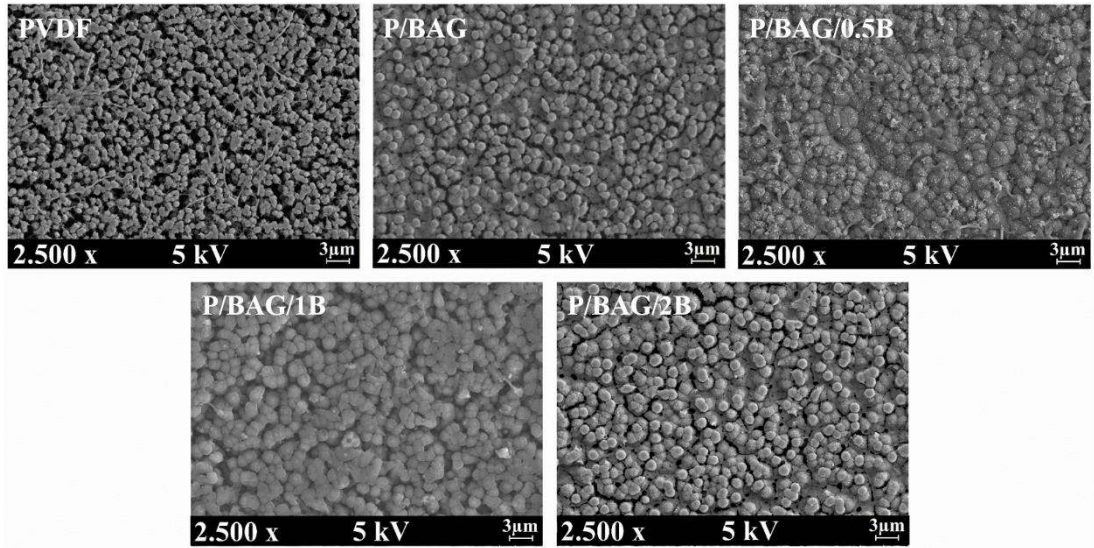


Şekil 4.3 : Sol-jel ve ısıt işlemleri ile sentezlenen BAG tozlarına ait XRD difraktogramı.

4.3.2 Bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin karakterizasyonu

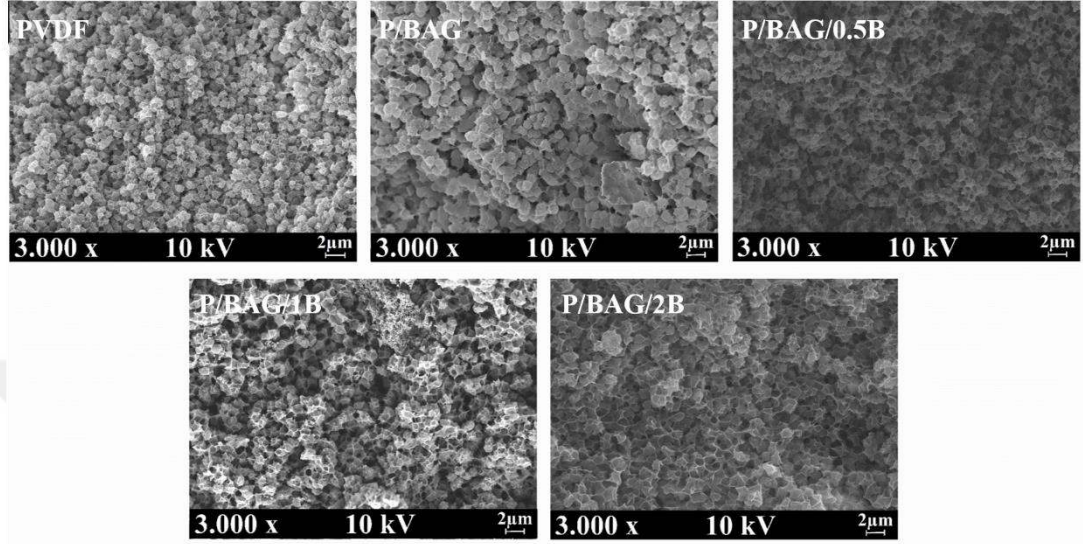
4.3.2.1 Morfolojik ve yüzey özellikleri

NIPS yöntemiyle üretilen farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin yüzey ve kesit SEM görüntüleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te gösterilmektedir.



Şekil 4.4 : NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri.

SEM görüntülerinde görüldüğü gibi, iskeleler yoğun bir yüzey katmanı ve gözenekli bir kesit yapısı ile karakterize edilen asimetrik bir morfoloji göstermiştir [236]. Bu asimetrik morfoloji, büyük ölçüde çözücü ve çözücü olmayan maddenin difüzyon hızına bağlıdır [176].

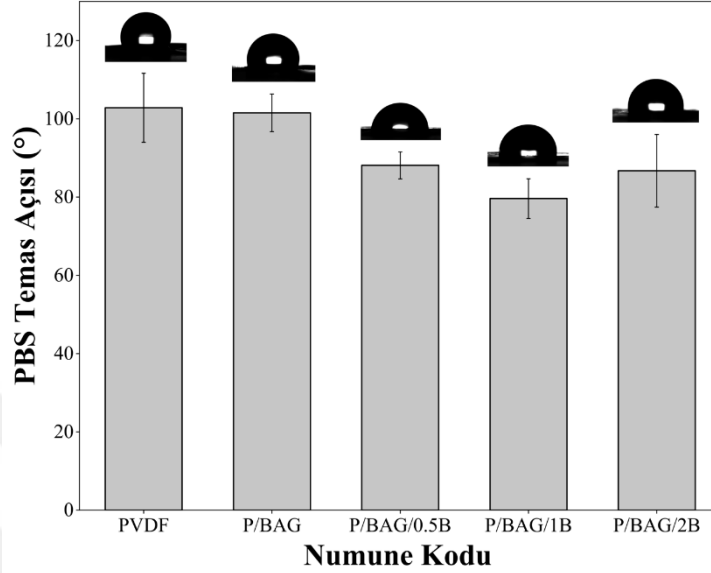


Şekil 4.5 : NIPS ve ardından liyofilizasyon ikili yöntemleriyle üretilen farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin kesit SEM görüntüleri.

Çözücü olarak DMF'nin ve çözücü olmayan olarak çözücüye karşı yüksek afinitesi olan suyun kullanıldığı koagülasyon banyo sistemlerinde, polimerik film banyoya daldırıldığında sıvı-sıvı ayrışma işlemi meydana gelir. Bu işlem, çözücü olmayan maddenin polimer çözeltisine nüfuz etmesiyle membranın yüzeyinde hızla gerçekleşir ve yoğun bir yüzey tabakasının oluşmasıyla sonuçlanır. Ayrıca, koagülasyon banyosunda su ile birlikte bulunan çözücü, banyodaki suyun aktivitesini azaltarak gecikmeli ayrışma koşullarını iyileştirmektedir [241]. Böylece, membranın iç kısmında koagülasyon süreci daha yavaş gerçekleşir ve petek benzeri mikro gözenekler oluşur [241]. Diğer bir taraftan, iskelelerin yüzey morfolojisi tozun polimer matrisine dahil edilmesinin yüzey tabakasının gözenekli yapısını önemli ölçüde değiştirmedigini ortaya koymuştur. Tüm iskelelerin belirli sınırlar içerisinde düzenli kesitsel gözenek yapısından oluştuğu söylenebilir.

Düzenli gözenekler ve uygun gözenek boyutu, besin ve oksijen difüzyonu ile atık gideriminde önemli bir rol oynamasının yanı sıra, kemik hücrelerinin yapışmasını, hücre-hücre etkileşimini ve hücre göçünü güçlü bir şekilde etkiler [44]. Çalışmanın bu bölümünde üretilen PVDF, P/BAG, P/BAG/0.5B, P/BAG/1B ve P/BAG/2B

iskelelerinin gözenek boyutları sırasıyla $0,67 \pm 0,2 \mu\text{m}$, $0,77 \pm 0,33 \mu\text{m}$, $1,17 \pm 0,28$, $1,24 \pm 0,32$, $1,2 \pm 0,35 \mu\text{m}$ olarak ölçülen birbirine bağlı kesitsel gözeneklerle karakterize edildi. P/BAG/1B numunesinin en yüksek gözenekliliğe sahip kesit morfolojisini gösterdiği söylenebilir.



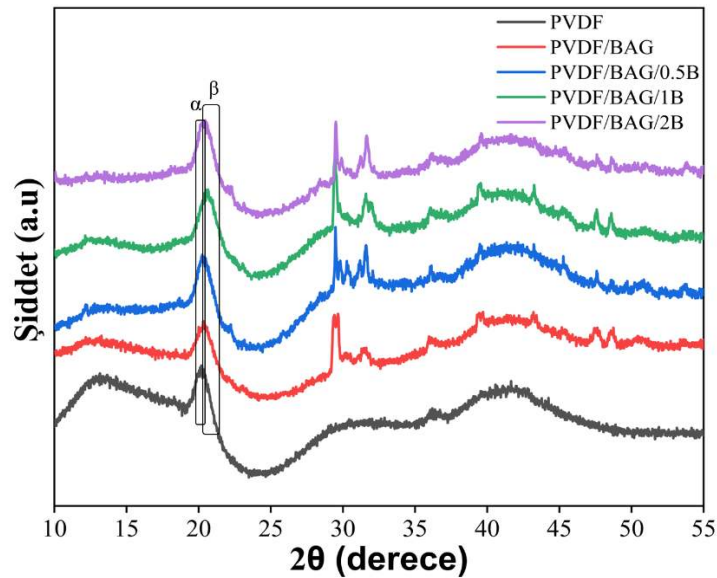
Şekil 4.6 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin temas açısı değerleri.

Uygun gözenekliliğe sahip iskeleler, kemik doku mühendisliği uygulamalarında hücre popülasyonlarıyla etkili bağlanma ve etkileşim için uygun yüzey özelliği gereksinimini de karşılamalıdır [209]. İdeal bir iskele, hidrofobik yüzeylere kıyasla daha iyi hücre yapışmasını ve yayılmasını destekleyen 90°'den daha az damlacık temas açısına sahip hidrofilik bir yüzeye sahip olmalıdır [231]. PVDF esaslı membran doku iskelelerinin üst ve alt yüzeylerinin yüzey hidrofilisitesini araştırmak için PBS ortamı kullanılarak temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6, numunelerin yüzey temas açısı ölçümlerinin ortalama değerlerini göstermektedir. Sonuçlara göre, iskelelerin temas açısı değerleri $86,72^\circ \pm 9,27^\circ$ ila $102,83^\circ \pm 8,8^\circ$ arasında değişen değerlerde ölçülmüştür. En yüksek temas açısı değerinin PVDF numunesinin yüzeyinde $102,83^\circ \pm 8,8^\circ$ olduğu gözlenmiştir. Numunelerin yüzey ıslanabilirliği, polimer matrise toz eklenmesiyle artmıştır. P/BAG, P/BAG/0.5B, P/BAG/1B ve P/BAG/2B numuneleri için temas açısı değerleri sırasıyla $101,53^\circ \pm 4,75^\circ$, $88,11^\circ \pm 3,44^\circ$, $79,62^\circ \pm 5,07^\circ$ ve $86,72^\circ \pm 9,27^\circ$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, önceki çalışmalarla uyumlu olarak, polimer matrise toz eklenmesinin yüzey özellikleri üzerinde olumlu etkiler yarattığını ortaya koymuştur [235,242]. Bu, tozların polimer

matrise dahil edilmesiyle iskelelerin yüzey morfolojisinde meydana gelen değişikliklerle ilgili olabilir. Tozların varlığı, katı-sıvı arayüz enerjisini değiştirerek daha yüksek yüzey pürüzlülüğüne yol açar. Katının yüzey enerjisi, sıvının yüzey geriliminden daha yüksek olduğunda, damlacık yüzeyde yayılır ve temas açısı değeri azalır, bunun sonucunda hidrofilite artar. Sonuç olarak, artan yüzey ıslanabilirliği hücreler için daha aktif bir yüzey sağlar ve bu da daha yüksek biyouyumlulukla sonuçlanır [243].

4.3.2.2 Termal özellikler, β faz içeriği ve mekanik özellikler

Bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin kristalin faz yapıları, Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde, saf PVDF numunesinde $2\theta = 20,0^\circ$ ’de görülen karakteristik pikin α -kristalinin (1 1 0) yansımalarıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Tozun PVDF matrisine dahil edilmesinden sonra, $2\theta = 20,0^\circ$ yerine yaklaşık $2\theta = 20,7^\circ$ ’de yansımanın ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu durum, β -kristal PVDF oluşumunu temsil etmektedir. Ayrıca, α fazına ait diğer karakteristik pikler kompozit yapıda gözlenmemiştir. Böylece, iskelelerdeki kristalin yapıların β -kristal fazda baskın olduğu sonucuna varılmıştır [244]. Diğer bir taraftan, Bölüm 4.3.1’de sunulan BAG fazına ait XRD pikleri, bu fazın kompozit membran iskelelerde varlığını ortaya koymuştur.

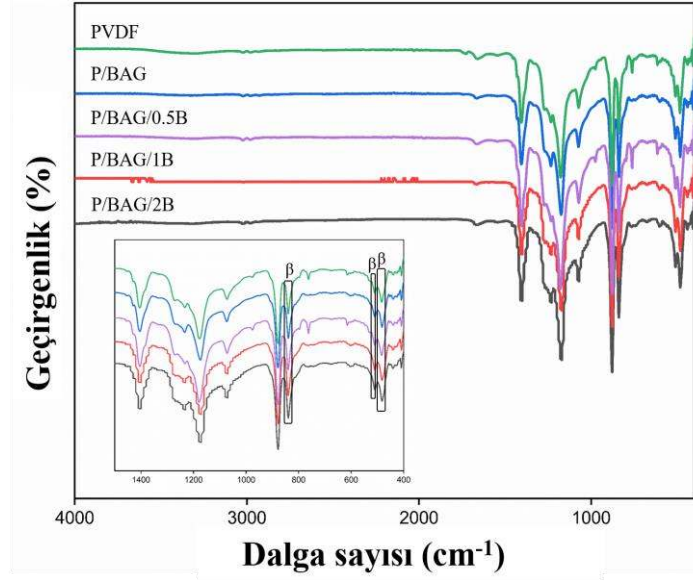


Şekil 4.7 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin XRD difraktogramları.

Malzemelerin kimyasal bağlarını veya moleküler yapılarını belirlemek için önemli olan FTIR, PVDF, BAG ve bor içeren iskelelerin fonksiyonel grupları hakkında bilgi

sağlamıştır [245]. İskelelerin FTIR spektrumları Şekil 4.8'de sunulmuştur. PVDF, BAG ve bor ile ilgili gerilme ve eğilme titreşimlerinin çeşitli karakteristik pikleri, numunelerin spektrumlarında verilmiştir. PVDF esaslı numuneler için 1400 cm^{-1} ve 795 cm^{-1} 'de görülen omuz, CH_2 gruplarının titreşimlerine atanmıştır [181]. 1068 cm^{-1} , 1147 cm^{-1} , 1179 cm^{-1} , 1166 cm^{-1} ve 1232 cm^{-1} 'deki fark edilebilir pikler, CF_2 gruplarının gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. Ayrıca, 766 cm^{-1} 'deki bandın CF_2 gruplarının eğilme titreşim moduyla ilişkili olduğu, 840 cm^{-1} 'deki dalga sayısında belirlenen pik noktasının ise, CH_2 salınım ve CF_2 asimetrik gerilme titreşimlerinin karışık modunu temsil ettiği ortaya çıkmıştır.

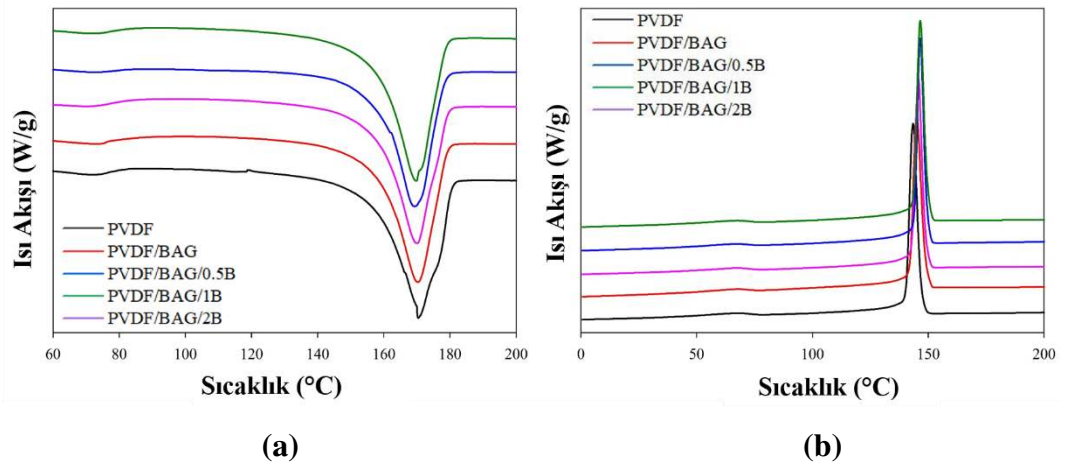
Toz katkılı kompozit numunelerin FTIR spektrumunun, saf PVDF numunesinden biraz farklı olduğu görülmüştür. Tozun eklenmesiyle BAG ve bor katkılı BAG, PVDF matrisiyle etkileşime girerek tüm pik yoğunluklarında bir azalmaya neden oldu. Kompozit numunelerde 992 , 971 , 948 , 917 , 863 ve 635 cm^{-1} 'deki dalga sayısında belirlenen pikler, SiO_4 tetrahedronunun polimer matrisle etkileşimiyle ilişkilendirilmiştir [132]. Ayrıca, 1043 cm^{-1} 'de bulunan ve silika ağı içinde Si-O-Zr gruplarının varlığına işaret eden bir belirteç görevi gören yeni bir pik gözlemlenmiştir [132]. Bu pikler, silikatla ilişkili olup, silika ağ yapısının oluşum mekanizmasına ilişkin değerli bilgiler sağlamaktadır. Ca-O 'yla ilişkili emilim bantları 515 ve 460 cm^{-1} 'de bulunmuştur [246]. Diğer bir taraftan, 783 cm^{-1} 'de bulunan pik, BO_3^{-3} grubunun simetrik eğilme titreşim moduyla ilişkilidir. FTIR sonuçları, kompozit iskelelerde BAG ve borun varlığını doğrulamıştır. Saf PVDF numunesine ait spektrumlarda bu piklerin bulunmaması, kompozit iskelelerin başarılı bir şekilde üretildiğinin kanıtı olarak gösterilebilir. Ayrıca, yaklaşık 763 ve 870 cm^{-1} 'deki bantlar α -fazıyla ilişkiliyken, 473 , 511 ve 838 cm^{-1} 'deki bantlar PVDF esaslı kompozit iskelelerin β -fazıyla ilişkilidir [98,175]. 1232 cm^{-1} 'deki bant ise, PVDF'nin γ -fazını temsil etmektedir [247]. Tozların PVDF matrisindeki değişimlerini daha iyi görselleştirmek için, değişimleri içeren spektrumlar şekle yerleştirilmiştir.



Şekil 4.8 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin XRD difraktogramları.

Membran iskelelerin Lambert-Beer yasasına (Denklem 2.3) göre hesaplanan β kristalizasyon oranları Çizelge 4.2’te sunulmuştur. PVDF, P/BAG, P/BAG/0.5B, P/BAG/1B ve P/BAG/2B numunelerinin F_β değerleri sırasıyla %96,55, %97,29, %97,84, %95,73 ve %97,19 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, tüm numunelerin β fazı içeriğinin yüksek olmasına rağmen, toz katkılı numunelerin saf PVDF numunesine kıyasla bir miktar iyileştiğini göstermiştir.

Üretilen iskelelerin termal davranışı DSC kullanılarak belirlenmiş ve ilgili ısıtma ve soğutma eğrileri sırasıyla Şekil 4.9(a) ve (b)’de verilmiştir. İskelelerin erime, kristalleşme sıcaklıkları ve kristalleşme davranışları Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.



Şekil 4.9 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin DSC termogramları: a) birinci ısıtma döngüsü, b) kristalizasyon.

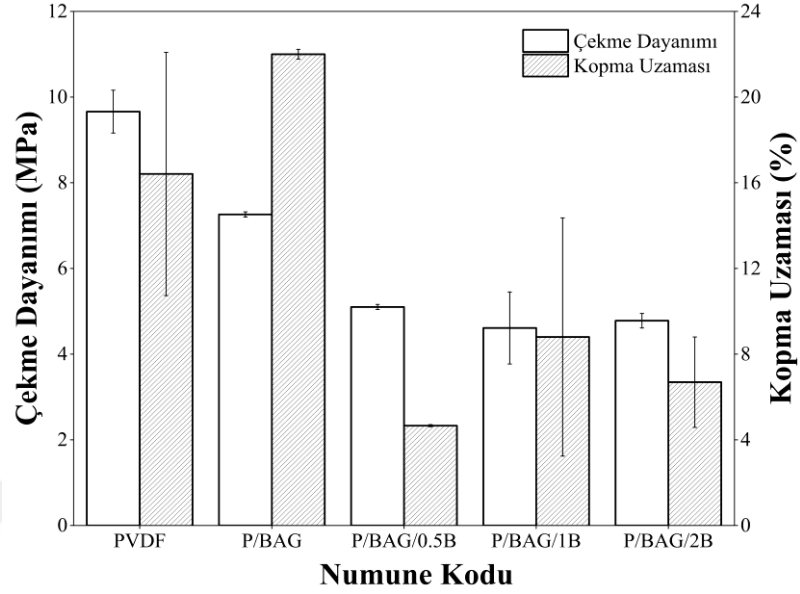
DSC verilerine göre, PVDF esaslı numunelerin erime sıcaklıkları yaklaşık 169-170 °C arasında iken, kristalleşme sıcaklıkları yaklaşık 143-146 °C arasında tespit edilmiştir. Numunelerin erime sıcaklıkları birbirine yakın olup, tozların eklenmesiyle kompozit numunelerin kristalleşme sıcaklıklarında hafif bir artış görülmüştür. Bu artış, PVDF matrisine katkı maddelerinin eklenmesinin heterojen çekirdeklenmeye neden olarak numunelerin kristalleşme sıcaklıklarını artırmasıyla ilgilidir. Ayrıca, PVDF numunesinin en yüksek toplam kristalliteye sahip olduğu bulunmuştur. DSC sonuçları, XRD ve FTIR sonuçlarıyla tutarlı olup, bu sonuçlarda, α -faz pikleri gözlenmezken, β -fazına ait pikler açıkça görülmüştür. Ayrıca, P/BAG/2B numunesine ilişkin olarak yaklaşık 173 °C'de oluşmaya başlayan omuz, piezoelektrik özelliklere sahip bir diğer faz olan γ -PVDF'in karakteristiğidir [179]. Diğer bir taraftan, Bölüm 3'te çözücü olmayan indüklenmiş faz ayrımı ile 20 °C koagülasyon banyosu sıcaklığında üretilen ağ. %1 bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran iskelelerde α -PVDF'e ait pikler bulunduğu gözlemlenmiştir. Çalışmanın bu bölümünde, aynı sıcaklıkta üretilen bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran iskelelerde β -fazının baskın olduğu gösterilmiştir. Bu durum, BAG tozlarının BCP'ye göre üstünlüğüne bir kanıt olarak hizmet edebilir.

Çizelge 4.2 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin % kristallinite oranı ve β faz fraksiyonu

Numune Kodu	T _{mβ} (°C)	Kristalizasyon Sıcaklığı (°C)	Kristallinite (X _c) (%)	β faz oranı (F _{β}) (%)
PVDF	170,21	143,32	58,55	96,55
P/BAG	170,21	145,12	56,51	97,29
P/BAG/0.5B	170,00	145,64	53,75	97,84
P/BAG/1B	169,22	146,40	53,01	95,73
P/BAG/2B	169,82	146,40	56,33	97,19

Mekanik özellikler, statik ve dinamik yükler altında bir yapı olan kemik dokunun yeniden yapılandırılması sürecinde iskele imalatında önemli bir rol oynar [236]. İskeleler belirli bir alanda uygulanmaları sırasında uygun strese dayanabilmeli ve hareketi sağlamak için yeterli esnekliği göstermelidir. Hazırlanan membran iskelelerin toz içeriğine bağlı mekanik performansı gerilim altında değerlendirilmiş ve ilgili gerilim-şekil değiştirme eğrileri Şekil 4.10'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar, PVDF numunesinin çekme mukavemetinin ve kopma anındaki uzamasının sırasıyla $7,26 \pm 0,06$ MPa ve %22 olduğunu, BAG tozlarının dahil edilmesiyle ise sırasıyla $6,28 \pm 0,1$ MPa ve $15,99 \pm 0,17$ olduğunu göstermiştir. Ağ. %0,5, %1 ve %2 bor dahil edilmesi, numunelerin çekme dayanımını ve kopma uzamasını sırasıyla $5,1 \pm 0,06$

MPa ve $4,66 \pm 0,05$, $4,61 \pm 0,84$ MPa ve $8,8 \pm 5,56$ ve $4,78 \pm 0,17$ MPa ve $6,69 \pm 2,11$ 'e düşürmüştür.



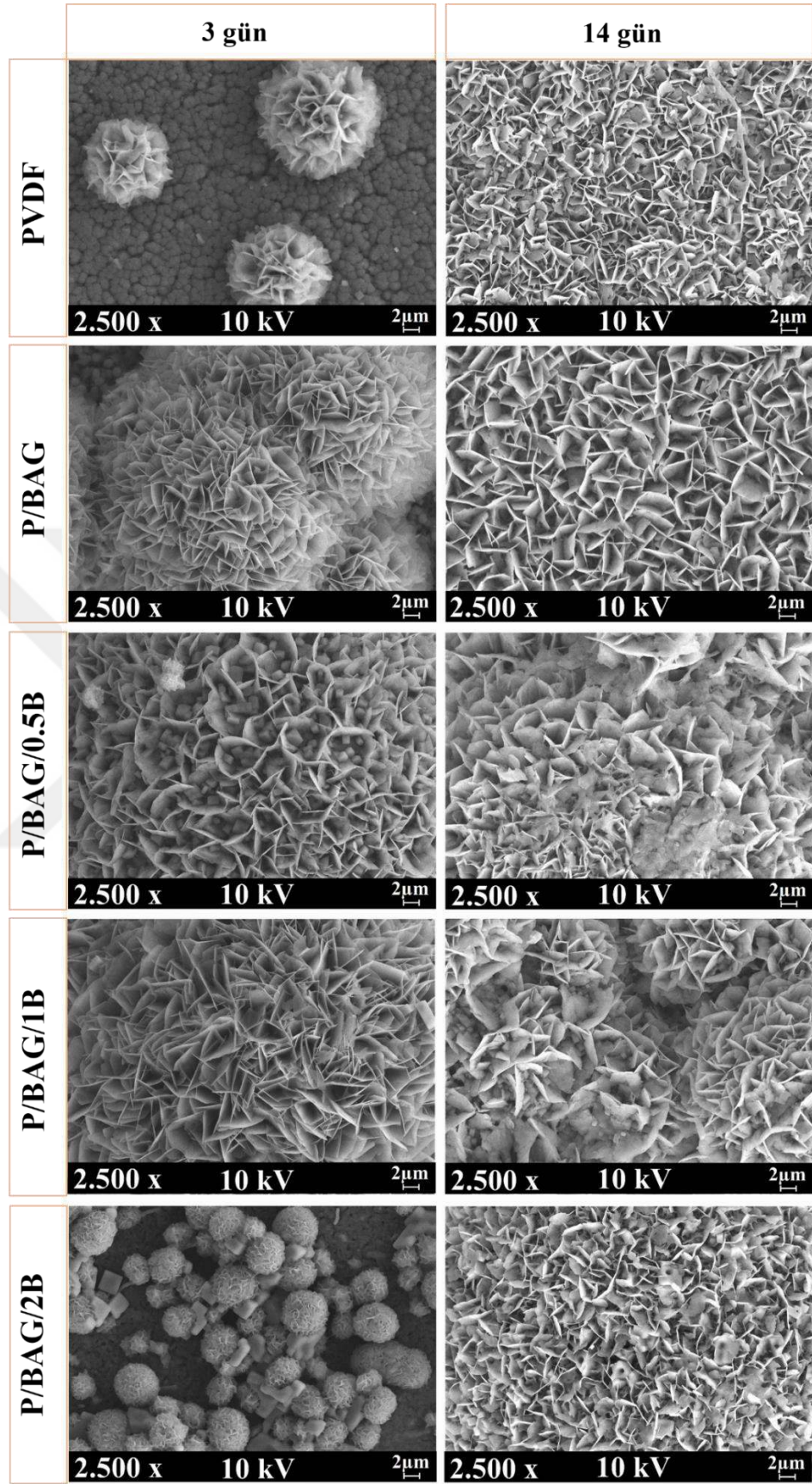
Şekil 4.10 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin çekme dayanımı - % uzama değerleri.

Gözenek boyutu ve iskele bileşiminin homojenliği gibi parametreler iskelelerin mekanik özelliklerini etkileyebilir [220]. Daha yüksek toz içeriğine sahip iskelelerin daha düşük mekanik mukavemeti, membran alt katmanındaki daha büyük gözenek boyutuyla ilişkilendirilmiştir. Büyük gözenekler besin ve oksijen iletimini hızlandırarak hücre büyümesini kolaylaştırmalarına rağmen, çok miktarda boşluk hacmi oluşturarak iskelelerin yapısal bütünlüğünü tehlikeye atar [220,248]. Benzer bir çalışmada Correia ve çalışma ekibi, PVDF esaslı üç boyutlu iskelelerin mekanik özelliklerinin artan gözenek boyutuyla azaldığını belirtmiştir [174]. Benzer şekilde Abzan ve çalışma ekibi [235], PVDF esaslı iskelelerde artan mikro boşlukların varlığının mekanik mukavemeti olumsuz etkilediğini raporlamıştır. Bununla birlikte, tozların aglomerasyonu da mekanik özelliklerin azalmasına neden olmuş olabilir. Polimer matristeki toz içeriği arttıkça, toz aglomerasyonu olasılığı da artar. Daha büyük gözeneklere ve artan gözenekliliğe sahip iskele yapısı, daha az homojen hale gelir ve bu da gözenek dağılımının heterojen yapısı nedeniyle azalan çekme dayanımına yol açar. Aksine, gözenek dağılımının homojenliği ve morfolojinin tutarlılığı, gerilim konsantrasyon noktalarını en aza indirdiği için daha iyi mekanik performans sağlar [247]. Saf PVDF esaslı numune, daha küçük ve eşit dağılmış gözenekler sergileyerek daha homojen bir morfoloji sağlar. Diğer bir taraftan,

iskelelerin kristalleşme davranışı da mekanik özelliklerini etkileyen önemli bir faktördür. Bölüm 4.3.2.2'de tartışılan kristalleşme davranışları ile ilgili olarak, en yüksek toplam kristallığe sahip PVDF numunesinin çekme dayanımı ve kopma uzaması diğer numunelerle karşılaştırıldığında en yüksektir. Polimer matristeki toz içeriği arttıkça, iskelelerin toplam kristallığına bağlı olarak mekanik özelliklerin azaldığı söylenebilir. Bu sonuçlar Bölüm 4.3.2.1'de elde edilen bulgularla da tutarlıdır. Diğer bir taraftan, çalışmanın bu bölümünde üretilen tüm iskelelerin çekme dayanımı, insan süngerimsi kemiğinkine yakın olduğu söylenebilir.

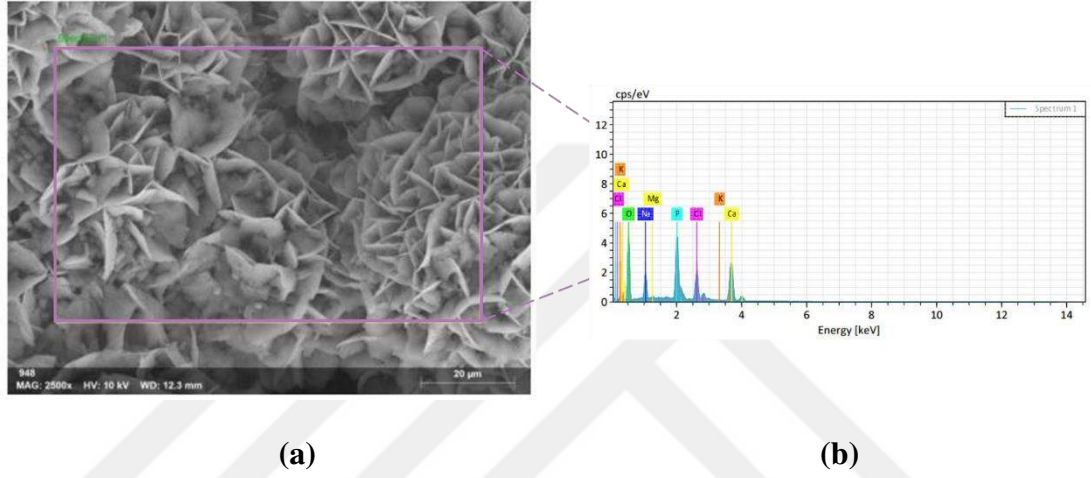
4.3.2.3 *In vitro* biyolojik özellikler

İdeal bir iskele, vücuda implante edildiğinde yüzeyinde biyolojik olarak aktif kemik benzeri apatit tabakasının oluşumunu sağlayacak biyoaktivite göstermelidir. Apatit tabakasının implant yüzeyi ile canlı kemik dokusu arasında bir arayüz olarak oluşumu, apatit ile aşırı doymuş metastabil bir kalsiyum fosfat çözeltisi olan SBF'den apatitin heterojen nükleasyonu ile elde edilir [236]. Silikat içeren biyoseramikler SBF çözeltisinde inkübe edildiğinde, malzeme-doku arayüzünde iyon değişimi, organik faz birikimi, hücre farklılaşması, bağlanma, çoğalma ve hücre dışı matris oluşumu şeklinde ilerleyen bir dizi karmaşık biyolojik reaksiyon, bu malzemelerin yüzeyinde mineralize bir apatit tabakasının oluşumuyla sonuçlanır [248]. İnkübasyon sırasında, SBF'deki hidronyum iyonları (H_3O^+), iskelelerin yüzeyindeki katyonların yerini alır ve biyoseramik malzemedeki silika ile reaksiyona girer. Bu, silikanın hidrolizi ve iskele yüzeyinde silanol (Si-OH) gruplarının oluşumu yoluyla Si-O-Si bağlarının kırılmasına yol açar. Böylece, silanol grupları apatit çekirdeklenmesini başlatır ve iskelelerde mineralize apatit tabakasının oluşumunu sağlar [174]. Çalışmanın bu bölümünde bor katkılı-BAG/PVDF içeren membran iskelelerin *in vitro* apatit oluşturma yeteneği, Bölüm 2.2.4 ve 3.2.3'te açıklanan prosedüre göre 10xSBF çözeltisi içerisinde araştırılmıştır. Şekil 4.11, 3 ve 14 gün boyunca 37 °C'de 10xSBF'de inkübasyondan önce ve sonra iskelelerin SEM görüntülerini göstermektedir.



Şekil 4.11 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri.

SEM görüntüleri incelendiğinde, yüzeylerdeki apatit tabakasının inkübasyonun 3. gününden sonra oluşmaya başladığı görülmüştür. Oluşan apatit çekirdeklerinin birikimi, daha uzun inkübasyon süreleri ile artar. 14 günlük inkübasyondan sonra, yüzeylerdeki çekirdeklenmenin arttığı gözlemlenmiştir. Bu apatitlerin, *in vitro* apatit büyüme sürecinin karakteristiği olan karnabahar benzeri küresel bir morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir [175]. Diğer bir taraftan, bu görüntüler inkübasyon öncesi SEM görüntüleriyle karşılaştırıldığında, tüm iskelelerin yüzeyinde apatit kristallerinin oluştuğu görülmektedir.

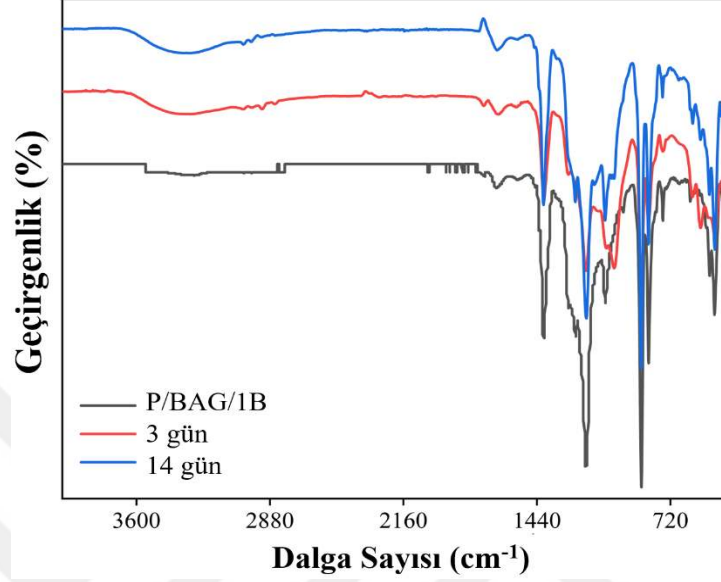


Şekil 4.12 : Ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelesinin 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen: (a) SEM görüntüsü; (b) (a)'da belirtilen alanın EDS analiz spektrumu.

Apatit kristallerindeki Ca ve P elementlerinin varlığı, membran iskelelerin yüzey SEM görüntülerinden rastgele bir alan seçilerek gerçekleştirilen EDS analizi ile doğrulanmıştır. P/BAG/1B numunesinin 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen SEM görüntüsü ve EDS spektrumu Şekil 4.12'de verilmiştir. Çekirdeklenmenin meydana geldiği bölgelerde yoğunlaşan apatit kristallerinin Ca/P oranının, doğal kemiğin 1,67 olan Ca/P değerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

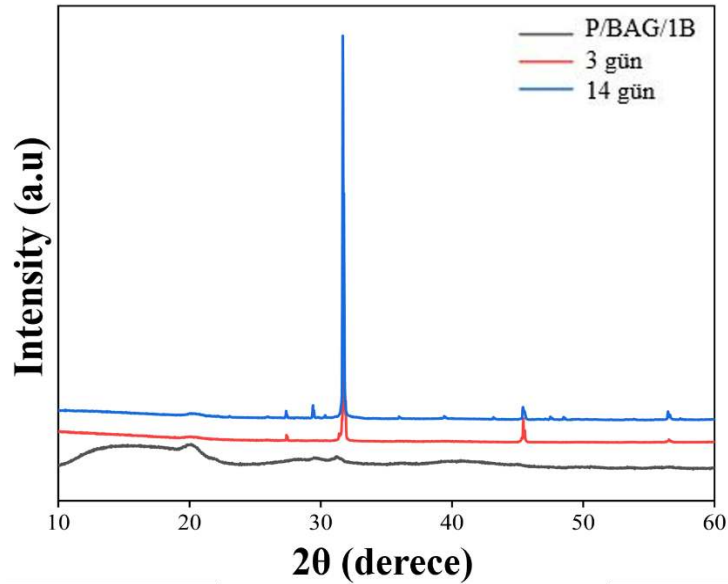
Seçilen P/BAG/1B numunesinin kimyasal bileşimindeki değişiklikler, 10×SBF'de 3 ve 14 günlük inkübasyondan öncesi ve sonrası FTIR spektrumları ile Şekil 4.13'te sunulmuştur. İnkübasyondan önceki spektrumlarla karşılaştırıldığında, PVDF, BAG ve B'ye ait karakteristik pikler, yoğunlukları azalmasına rağmen inkübasyondan sonra da görülmeye devam etmiştir. Ayrıca, CaP'nin PO_4^{3-} gruplarının simetrik ve asimetrik gerilme modlarını temsil eden ek bantlar, apatitlerin yapısal bileşimi hakkında bilgi vermektedir. 560 ve 600 cm^{-1} 'de bulunan bu bantlar, P-O bükülme titreşimlerine atfedilen apatit ile ilişkiliyken, yaklaşık 870 cm^{-1} 'de ve yaklaşık 1375 ile 1555 cm^{-1}

arasındaki geniş bantın PO_4^{-3} 'e ait olduğu tespit edilmiştir [98]. Buna ek olarak, apatit tabakasında H_2O tarafından adsorbe edilen OH titreşimlerinin daha önce görülebilen varlığı, yaklaşık 1650 cm^{-1} 'de bir bant ve 3100 ile 3600 cm^{-1} arasında geniş bir bant olarak ortaya çıkmıştır [247].



Şekil 4.13 : Ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelesinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası elde edilen FTIR spektrumu.

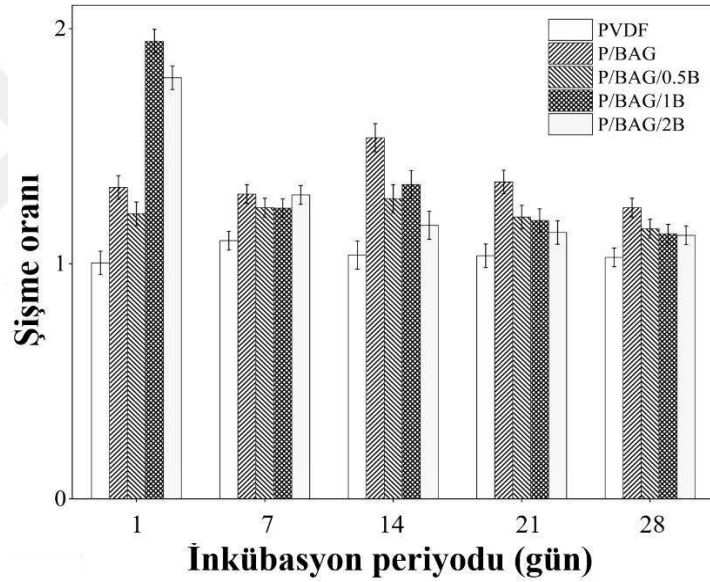
Seçilen P/BAG/1B numunesinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası apatit oluşumu ve büyümesi XRD difraktogramları ile Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14 : Ağ. %1 bor katkılı membran doku iskelesinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası elde edilen XRD difraktogramı.

Apatit tabakasına ait difraktogramlar, Bölüm 2.3.2.4 ve 3.3.1.3’de açıklandığı gibi $2\theta = 32^\circ$ ve 46° ’de kristalin tepe noktaları göstermektedir. Difraksiyon desenleri karşılaştırıldığında, pik yoğunluğunda bir artış gözlemlenmiştir. Bu artış, inkübasyon süresi arttıkça artmış olup, iskelelerin yüzeylerinde apatit büyümesine atfedilmiştir. Bu bulgular, membran iskelelerinin biyoaktivitesini açıkça ortaya koyarak, P/BAG/1B numunesinin yüzeyinde apatit oluşumundaki önemli artışı vurgulamaktadır.

Vücut sıvılarının emilimini, hücre besinlerinin ve metabolitlerin iskele içinde transferini sağlayan şişme yeteneği, biyolojik etkileşimlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [98,249]. İskeleler, vücuda uyum için kritik olan çevreleyen ortama yanıt olarak farklı şişme davranışları sergiler. İskelelerin şişme deneyleri, numunelerin PBS (37°C , $\text{pH}=7.4$) içerisine 28 gün boyunca daldırılmasıyla gerçekleştirilmiş ve elde edilen şişme değerleri Şekil 4.15’te verilmiştir.



Şekil 4.15 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin şişme değerleri.

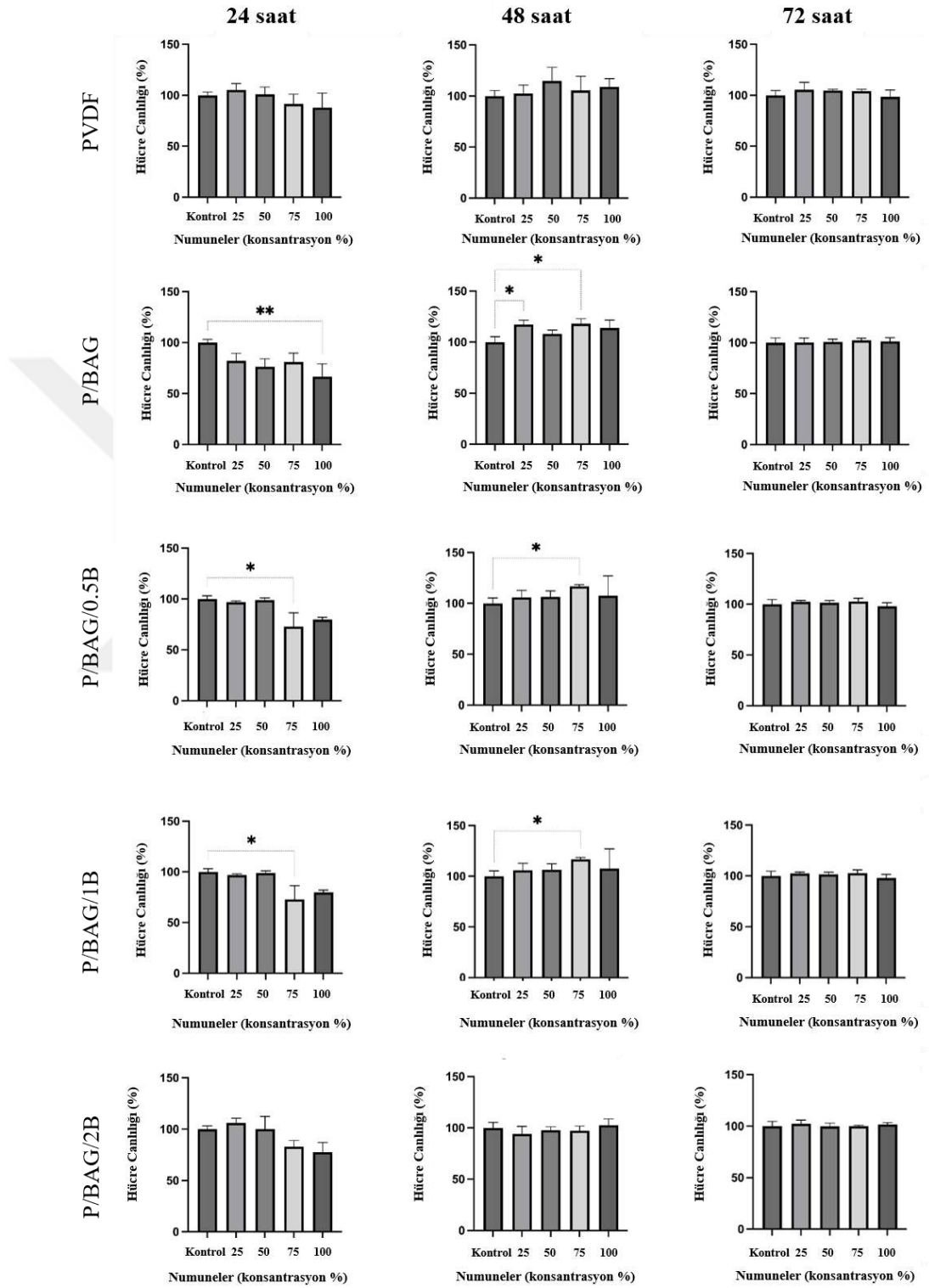
Şekil 4.15 incelendiğinde, tüm iskeleler ilk 24 saat içerisinde hızla şişmiş ve şişme bir süre sonra bir denge seviyesinde sabitlenmiştir. En yüksek şişme derecesinin, 24 saatlik inkübasyon sonrası P/BAG/1B numunesinde olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir taraftan, toz içeren numunelerin şişme oranı, saf PVDF numunesine kıyasla daha uzun bir süre sonra denge seviyesine ulaşmıştır. PVDF numunesindeki şişme 7. günden sonra azalırken, toz katkılı numunelerdeki şişme 14. güne kadar artmış ve daha sonra azalma eğilimi göstermiştir. Bu durum, numunelerin farklı zamanlarda doygunluğa ulaşmasına ve maksimum şişme kapasitelerine ulaşmasıyla ilişkilendirilebilir [98].

Genel olarak, tozların polimer matrise dahil edilmesi, 28. güne kadar şişme oranında bir azalmaya yol açmıştır. Diğer bir taraftan, toz katkılı numuneler kendi içlerinde değerlendirildiğinde, daha yüksek bor içeriğine sahip numunelerdeki şişme oranı, BAG içeren numuneye kıyasla daha düşüktür. Daha düşük toz içeriğine sahip iskelelerin 28 günün sonunda farklı şişme davranışları ve düşük şişme eğilimi, Bölüm 4.3.2.1'de daha önce açıklanan yüzey temas açısı sonuçlarını da tamamlamıştır. Düşük temas açısı ve artan hidrofilisite, suya karşı yüksek afinite ve daha iyi su emilimini göstermektedir. Ayrıca, düşük toz içeriğinin partikül dağılımını iyileştirmesi ve daha iyi performans üretmesi, iskelelerdeki olası uygulamalara odaklanmaktadır.

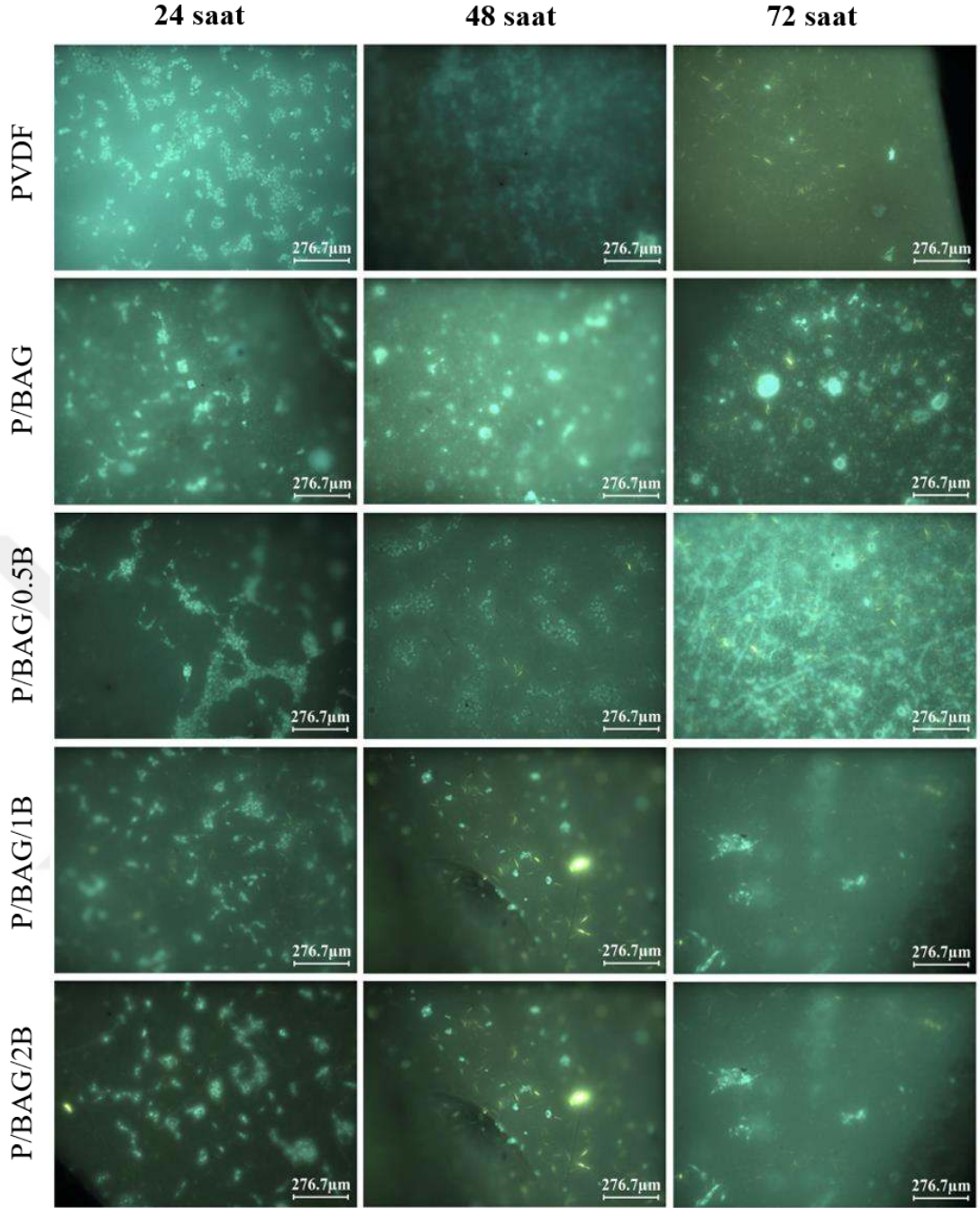
4.3.2.4 *In vitro* hücresel aktivite

Çalışmanın bu bölümünde, bor katkılı-BAG/PVDF içeren membran iskelelerin *in vitro* sitotoksitesite analizi 72 saat boyunca HOb hücreleri kullanılarak MTT analizi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.16, iskelelerin 24, 48 ve 72 saatlik hücre maruziyeti dönemleri için sitotoksitesite analizinin sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.16 incelendiğinde, ilk 24 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda PVDF numunesi için %25, %50, %75 ve %100 konsanstrasyondaki ekstraktlar için hücre canlılığı sırasıyla %100, %105,3, %101,1, %91,44 ve %87,90 olarak kaydedilmiştir. 48 saat sonra sırasıyla %100,0, %102,3, %114,7, %105,4 ve %109,1 olarak değişen hücre canlılığı, 72 saat sonra %100,0, %105,4, %104,6, %103,9 ve %98,38 olarak ölçülmüştür. PVDF/BAG numunesi için %25, %50, %75 ve %100 konsanstrasyondaki ekstraktlar için hücre canlılığı 24 saat sonra %100,0, %82,07, %76,13, %80,94, %66,41 iken, 48 saat sonra sırasıyla %100,0, %117,3, %108,2, %118,1, %113,8'e yükseldiği gözlenmiştir. 72 saatin sonunda sırasıyla %100,0, %100,0, %100,8, %102,2 ve %101,3 olarak kaydedilmiştir. PVDF/BAG/0.5B numunesi için %25, %50, %75 ve %100 konsanstrasyondaki ekstraktlar için hücre canlılığı 24 saat sonra %100,0, %96,92, %99,02, %72,94, %79,66 sonuçlarını verirken, 48 saat sonra sırasıyla %100,0, %105,9, %106,4, %116,9, %107,7 ve 72 saat sonra sırasıyla %100,0, %102,4, %101,5, %102,8 ve %98,07 olarak değişmiştir. Hücrelerin PVDF/BAG/1B ile inkübasyonunun ilk 24 saati, sırasıyla %100,0, %106,7, %105,7, %102,2 ve %98,75 canlılık sonuçlarını verirken, 48 saat inkübe edilen numunelerin canlılığı, %100,0, %104,9, %105,3, %109,0, %105,1'e olarak, 72 saat inkübe edilen numunelerin canlılığı %100,0, %99,39, %101,0, %101,0, %97,48 olarak ölçülmüştür. PVDF/BAG/2B numunesi için ise 24 saatlik inkübasyondan sonra hücre canlılığı sırasıyla %100,0, %106,2, %100,0,

%83,04 ve %77,68 olarak, 48 saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla %100,0, %94,17, %97,18 ve %102,6 olarak ve 72 saatin sonunda sırasıyla %100,0, %102,4, %99,78 ve %101,5 olarak değişmiştir.



Şekil 4.16 : Farklı oranlarda bor katkıli BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin konsantrasyona bağlı hücre canlılığı değerleri.



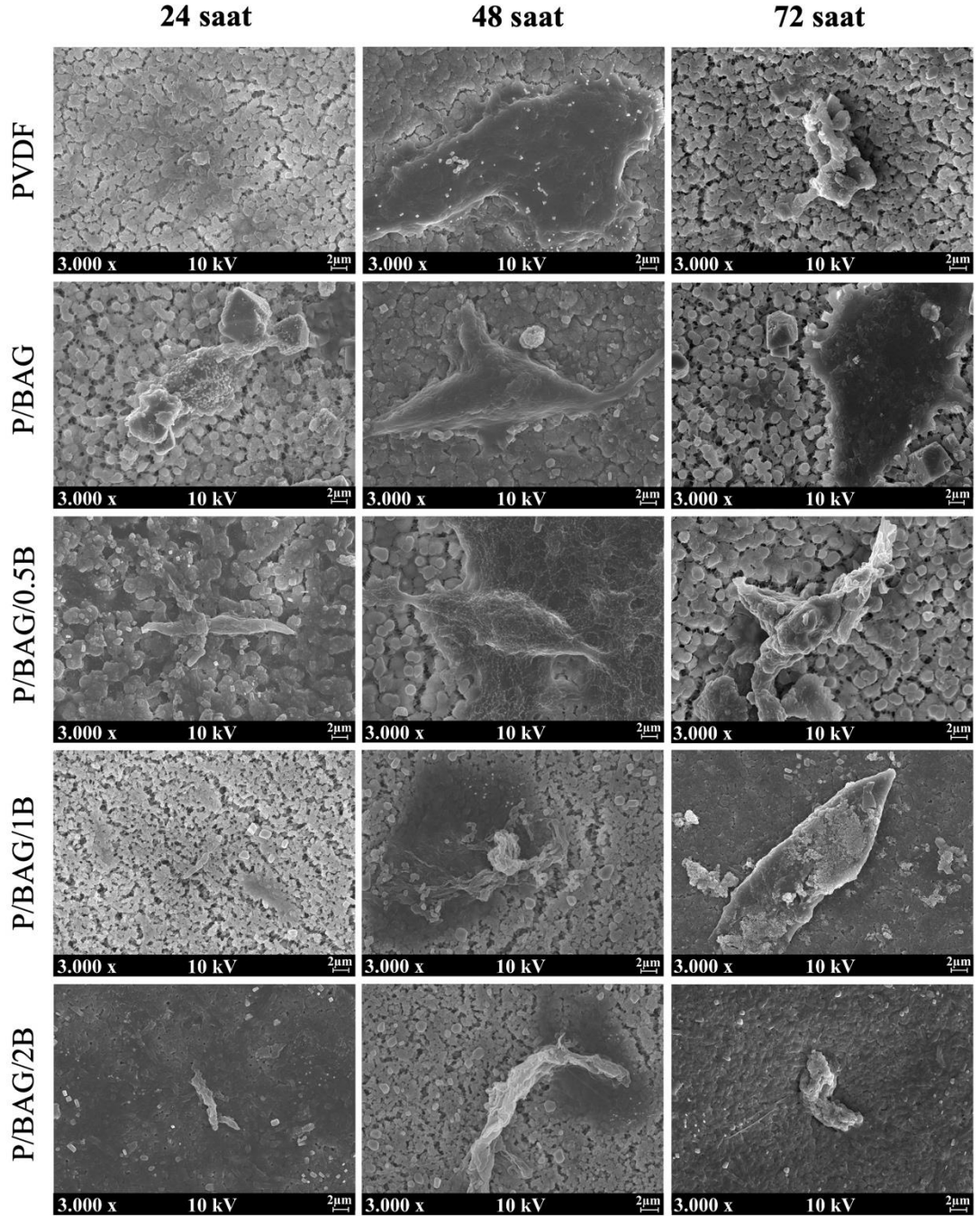
Şekil 4.17 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası floresan mikroskobu görüntüleri.

Hücre kültürü sonuçlarına göre, PVDF esaslı iskelelerin kontrole benzer canlılık sonuçları ile yüksek biyoyumluluk gösterdiği söylenebilir. PVDF esaslı iskelelere BAG eklenmesi ile numunelerin artan konsantrasyonlarda kontrolden daha düşük canlılık gösterdiği, ancak hayatta kalan hücrelerin canlılığının 48 saat sonra arttığı ve kontrole benzer canlılık gösterdiği sonucuna varılabilir. PVDF/BAG/0.5B numuneleri için 48 saatlik inkübasyonun sonunda hücre canlılığında artış gözlenirken, PVDF/BAG/1B numuneleri, her 3 günde bir hemen hemen tüm dozlar için kontrole

benzer veya daha yüksek canlılık sonuçları göstermiştir. İskelelerdeki bor miktarının artması, PVDF/BAG/2B numunesi için hücre canlılığını ilk 24 saatlik inkübasyonun sonunda %75 ve %100 konsantrasyonlarda azaltırken, tüm dozlar 48 saat sonra artan bir canlılık göstermiştir. Tüm numuneler birlikte değerlendirildiğinde, PVDF/BAG/1B numunesi için en iyi hücre canlılığı sonuçlarını gösterdiği söylenebilir.

İskelelerdeki hücresel yapışma, hücrelerdeki çekirdeklerin DAPI ile floresan etiketlenmesi yoluyla görselleştirilip floresan mikroskopisi ve SEM ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de sunulmuştur. Şekil 4.17'deki floresan mikroskop ve Şekil 4.18'deki SEM görüntüleri incelendiğinde, kültürlenmiş hücrelerin iyi tutunduğu ve iskelelere yayıldığı görülmüştür. Hücre canlılığı sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, numunelerin sitotoksikite olmaksızın hücrelerin yüzeylerine yapışabildiği sonucuna varılabilir. Yapılan çalışmalarda, BAG içeren iskelelerin osteoblast, osteoklast ve endotel hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını desteklediği raporlanmıştır [250]. Yakın zamanda Forogh ve çalışma ekibi [251] tarafından yapılan bir çalışmada, PCL esaslı lifli iskelelere yapılan BAG ilavesinin mekanik özellikler, ıslanabilirlik, apatit oluşumu ve biyobozunurluğun yanı sıra, L929 fare fibroblast hücrelerinin canlılığını arttırdığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, BAG içeren PCL esaslı iskelerin mekanik özellikleri ve apatit oluşumunu arttırdığı, MG63 osteoblast benzeri fibrosarkom hücrelerinin yapışmasını iyileştirdiği raporlanmıştır [236]. Bir diğer çalışmada Najar ve çalışma ekibi [65], BAG ile post modifiye edilmiş 3 boyutlu PCL esaslı iskelelerin post modifikasyon ile hidrolitik bozunma oranının, insan mezenkimal kök hücrelerinin osteogenik farklılaşmasının, kalsiyum birikiminin ve kemikle ilişkili osteokalsin, osteonektin, ALP ve RUNX gibi genlerin ekspresyonunun iyileştirildiğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada, *in vitro* kemik büyümesi için biyomimetik bir mikroçevre, yüksek MG63 hücre canlılığına sahip farklı miktarlarda BAG içeren 3 boyutlu PCL esaslı iskelelerle elde edilmiştir [252]. Tavakoli ve çalışma ekibi [253], vankomisin içeren polimetilmetakrilat (PMMA) kemik çimentosunda grafen oksit kapsüllenmiş BAG (GOBgh) nanopartiküllerinin radyopasifleştirici ve biyoaktif özelliklerini araştırmıştır. PMMA'ya GOBgh eklenmesi, basma dayanımı, elastikiyet modülü, radyoopasite, antibakteriyel aktivite, apatit oluşumunu arttırmasının yanı sıra, MG63 osteoblast benzeri fibrosarkom hücrelerinin ve yüzeydeki insan yağ dokusundan

türetilen mezenkimal kök hücrelerinin osteogenik farklılaşması ile Corio allantoik membran testi ile tanımlanan anjiyogenez aktivitesini artırmış ve sıçan modellerinde mineralizasyon ile kemik entegrasyonu açıkça gözlenmiştir.



Şekil 4.18 : Farklı oranlarda bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası SEM görüntüleri.

Bir diğer çalışmada [68], plazma püskürtülmüş HA, BAG ve BAG takviyeli karbon nanotüp (CNT) kaplamaları titanyum alt tabaka üzerine biriktirilmiş ve BAG takviyeli CNT kaplamalarının artan mikro sertlik, azalan gözeneklilik ve yüzeyde iyileştirilmiş MC3T3-E1 osteoblast hücre yapışması gösterdiği bildirilmiştir. BAG içeren polilaktik

asit (PLA) ve kitosan- vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) kaplı 3 boyutlu iskelelerin, yüksek gözeneklilik, basma dayanımı, elastik modül, anjiyojenik aktivite ve sıçan mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşması gösterdiği raporlanmıştır [254,255]. Diğer bir taraftan, hücrelerin kemik oluşumu için iletken olan hidrofilik yüzeylere iyi yapıştığı bilinmektedir [256]. Wei ve çalışma ekibi [255], yüzey ıslanabilirliği artışıyla ilişkili olarak osteoblast hücrelerinin yapışmasının arttığını raporlamıştır. Bölüm 4.3.2.1’de açıklanan temas açısı sonuçlarıyla tutarlı olarak, bor katkısının temas açısını azaltarak hidrofilisiteyi arttırdığı ve en düşük temas açısı değerinin diğer numunelerle karşılaştırıldığında hücre canlılığı ve yapışmasını iyileştiren PVDF/BAG/1B numunesi için ölçüldüğü tespit edilmiştir.

4.3.3 Ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin karakterizasyonu

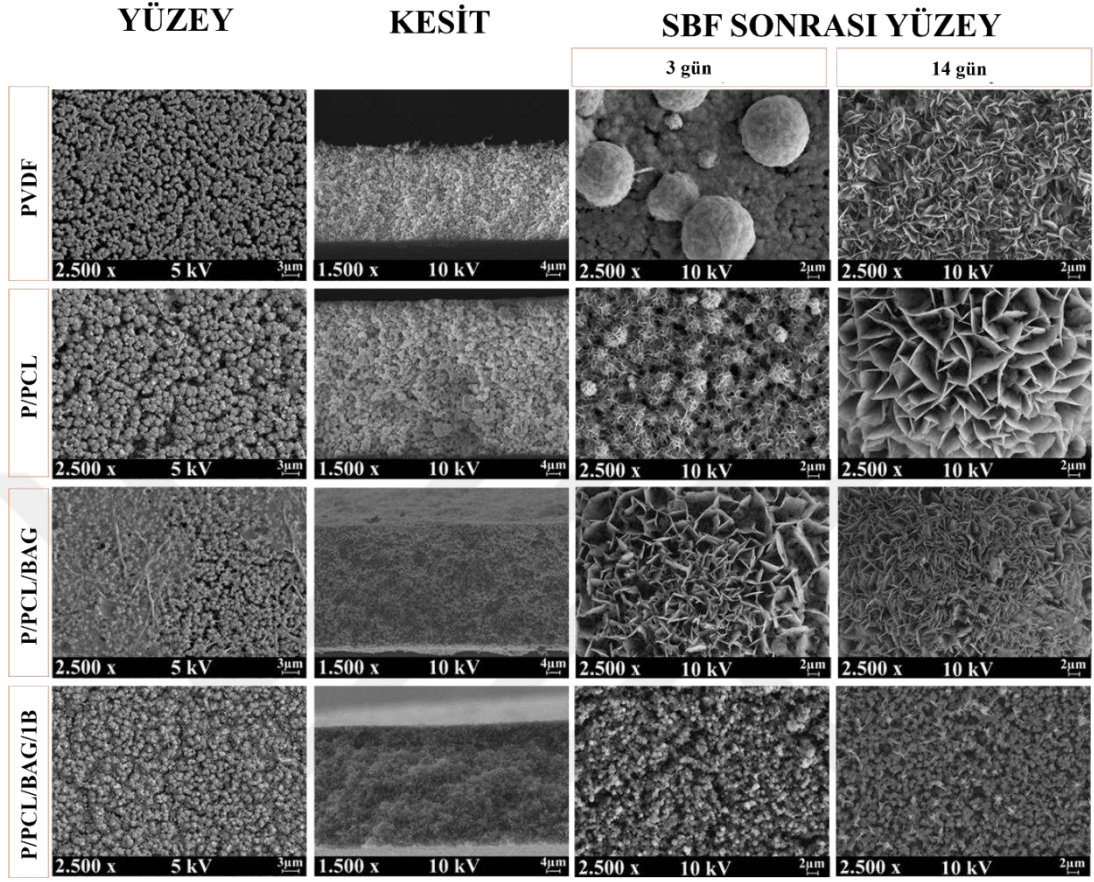
4.3.3.1 Morfolojik özellikler

NIPS yöntemiyle 20 °C koagülasyon banyo sıcaklığında üretilen ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin yüzey ve kesit SEM görüntüleri Şekil 4.19’da gösterilmektedir. Şekil 4.19 incelendiğinde, iskelelerin tipik yoğun yüzey katmanı ve bu katmanın altında gözenekli bir kesit yapısı ile karakterize edilen asimetric bir morfoloji sergilediği görülmektedir. Bu morfoloji, çözücü ve çözücü olmayan maddenin difüzyon hızına bağlıdır [176]. Bununla birlikte, PVDF, P/PCL, P/PCL/BAG ve P/PCL/BAG/1B iskelelerinin gözenek boyutları sırasıyla $1,26 \pm 0,22$ μm , $1,08 \pm 0,31$ μm , $1,35 \pm 0,19$, $1,24 \pm 0,32$ μm olarak ölçülen birbirine bağlı kesitsel gözeneklerle karakterize edilmiştir.

4.3.3.2 *In vitro* biyolojik özellikler

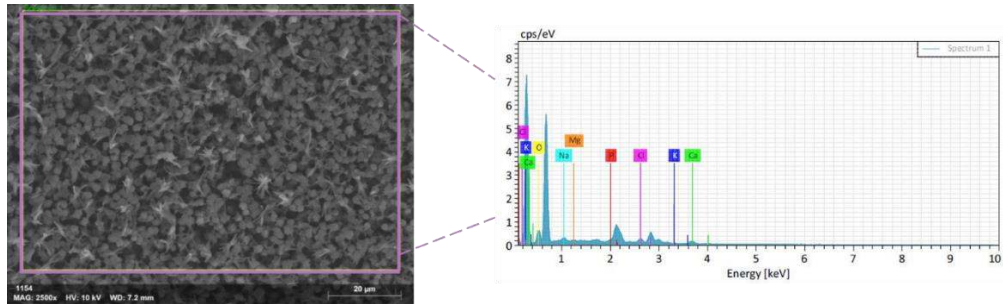
Ağ. %1 bor katkılı-BAG/PVDF-PCL içeren membran iskelelerin 3 ve 14 gün boyunca SBF içerisinde inkübe edilmeleriyle *in vitro* biyoaktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. 3 ve 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.19’da verilmiştir. Şekil 4.19 incelendiğinde, yüzeylerdeki karnabahar benzeri morfolojiye sahip apatitlerin inkübasyonun 3. gününden sonra oluşmaya başladığı ve zamanla apatit çekirdeklenmesinin arttığı görülmüştür. 14 günlük inkübasyon sonrası oluşan çekirdekli apatitlerin numunelerin tüm yüzeyini kapladığı gözlenmiştir. Diğer bir taraftan, bu görüntüler inkübasyon öncesi SEM

görüntüleriyle karşılaştırıldığında, tüm iskelelerin yüzeyinde apatit kristallerinin başarılı bir şekilde oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.19 : Ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin 3 ve 14 günlük inkübasyon öncesi ve sonrası yüzey ve kesit SEM görüntüleri.

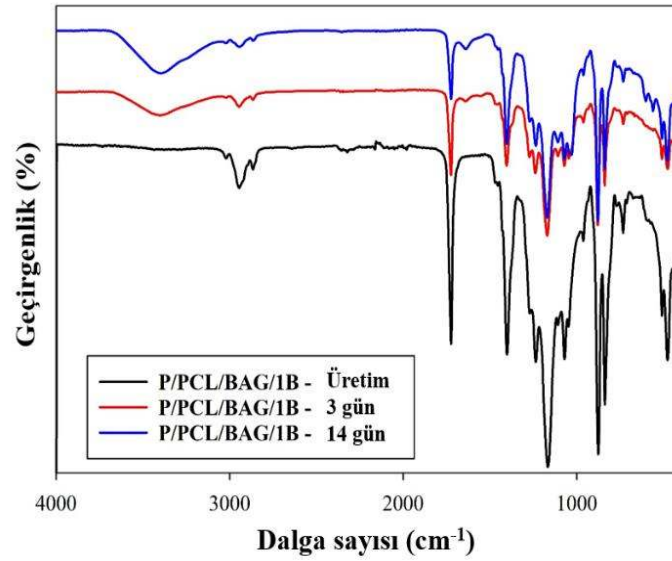
Apatit kristallerindeki Ca ve P elementlerinin varlığı, membran iskelelerin yüzey SEM görüntülerinden rastgele bir alan seçilerek gerçekleştirilen EDS analizi ile doğrulanmıştır.



Şekil 4.20 : 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran iskelelerin (a) SEM görüntüsü; (b) (a)'da belirtilen alanın EDS analiz spektrumu.

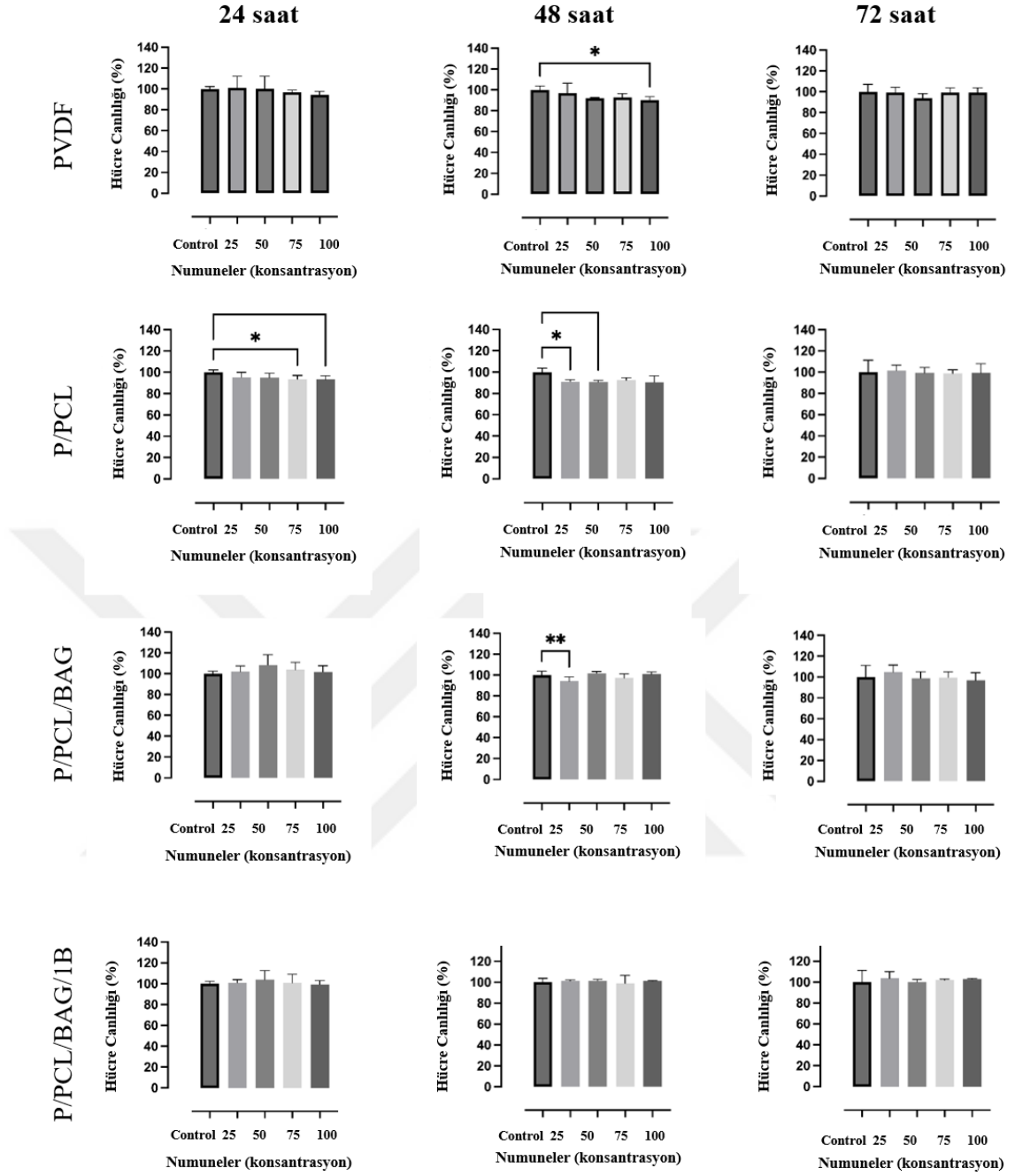
P/PCL/BAG/1B numunesinin 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen SEM görüntüsü ve EDS spektrumu Şekil 4.20’de verilmiştir. Çekirdeklenmenin meydana geldiği bölgelerde yoğunlaşan apatit kristallerinin Ca/P oranının, doğal kemiğin 1,67 olan Ca/P değerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Seçilen P/PCL/BAG/1B numunesinin kimyasal bileşimindeki değişiklikler, 10×SBF’de 3 ve 14 günlük inkübasyondan öncesi ve sonrası FTIR spektrumları ile Şekil 4.21’de sunulmuştur. İnkübasyondan önceki spektrumla karşılaştırıldığında, PVDF, PCL, BAG ve B’ye ait karakteristik pikler, yoğunlukları azalmasına rağmen inkübasyondan sonra da görülmeye devam etmiştir. İnkübasyon sonrası iskelelerin yüzeyinde oluşan apatitlere ait pikler, 560 ve 600 cm^{-1} ’de tespit edilmiştir. Bu bantlar, CaP’nin PO_4^{3-} gruplarının simetrik ve asimetrik gerilme modlarını temsil etmektedir. Ayrıca, yaklaşık 870 cm^{-1} ’de ve yaklaşık 1375 ile 1555 cm^{-1} arasındaki geniş bantın PO_4^{3-} ’e ait olduğu tespit edilmiştir [98]. Buna ek olarak, apatit tabakasında H_2O tarafından adsorbe edilen OH titreşimlerinin daha önce görülebilen varlığı, yaklaşık 1650 cm^{-1} ’de bir bant ve 3100 ile 3600 cm^{-1} arasında geniş bir bant olarak ortaya çıkmıştır [247].



Şekil 4.21 : 3 ve 14 günlük inkübasyon sonrası elde edilen ağ. %1 bor katkılı membran iskelelerin FTIR spektrumu.

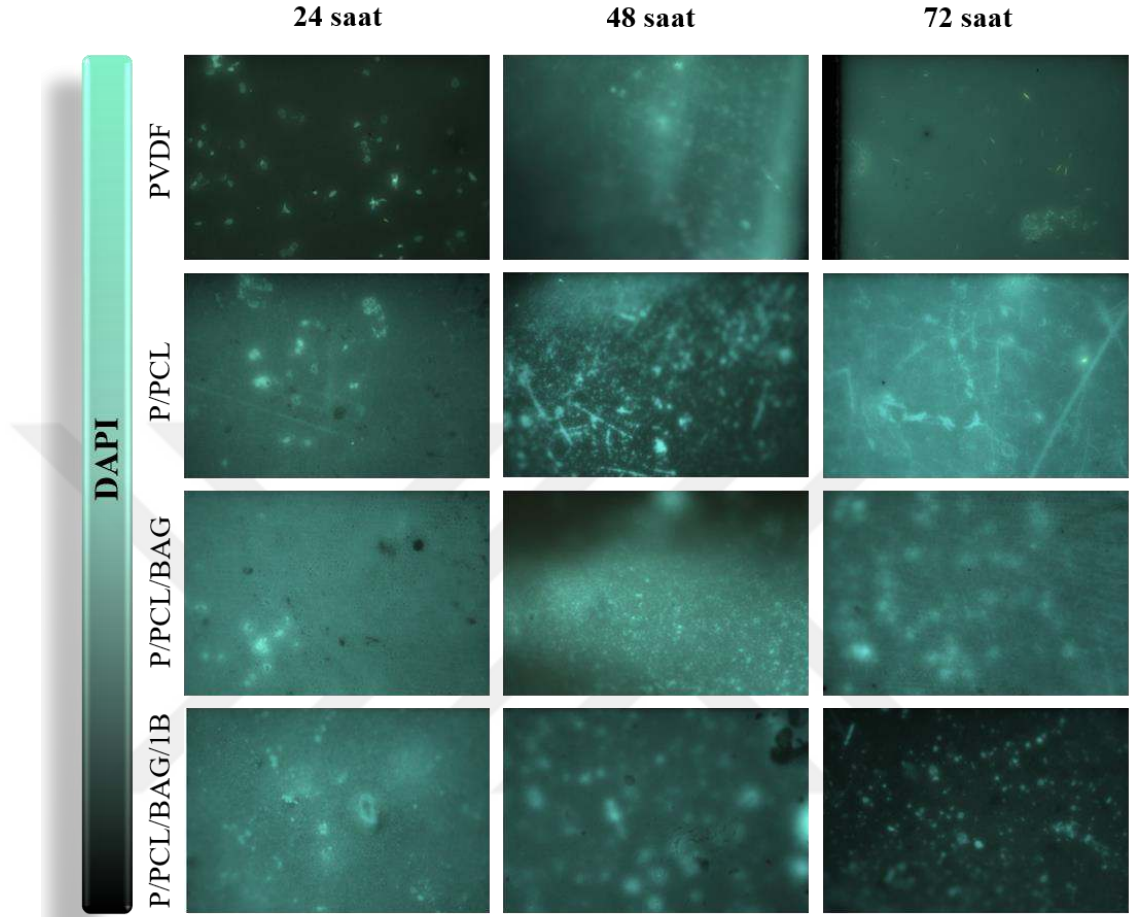
Ağ. %1 bor katkılı-BAG/PVDF-PCL içeren membran iskelelerin *in vitro* sitotoksosite analizi 72 saat boyunca HOB hücreleri kullanılarak MTT analizi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.22, iskelelerin 24, 48 ve 72 saatlik hücre maruziyeti dönemleri için sitotoksosite analizinin sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.22 : Ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin konsantrasyona bağlı hücre canlılığı değerleri.

Şekil 4.22 incelendiğinde, 72 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda tüm numuneler için %25, %50, %75 ve %100 konsantrasyondaki ekstraktlar için hücre canlılıkları %90 üzeri olarak kaydedilmiştir. Her üç günde de kontrole yakın ve kontrolün üzerinde canlılık gözlemlenen konsantrasyonlar mevcuttur. P/PCL numunesi için 72 saatin sonunda tüm günler içerisinde en yüksek hücre canlılığı gözlenirken, numunelere BAG dahil edildiğinde P/PCL/BAG numunesi için ilk 24 saat sonunda %25 konsantrasyon en yüksek canlılığı göstermiştir. Borun dahil edilmesi ile ise, 72

saat sonunda %112.5 konsantrasyon en yüksek canlılığı göstermiştir. Tüm numunelerin hücre canlılıkları incelendiğinde, PCL ve BAG katkısının hücre canlılığı üzerinde olumlu etki gösterdiği gözlemlenmektedir.



Şekil 4.23 : Ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası floresan mikroskobu görüntüleri.

İskelelerdeki hücresel yapışma, hücrelerdeki çekirdeklerin DAPI ile floresan etiketlenmesi yoluyla görselleştirilip floresan mikroskopisi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.23'te sunulmuştur. Şekil 4.23 incelendiğinde, hücrelerin numune yüzeylerinde parlama sebebiyle görüntülenmesi ve fotoğraflanması konusunda zorluklar yaşanmıştır. Ancak genel olarak bakıldığında, hücrelerin numunelerin üzerine yapıştığı gözlemlenmektedir. Fiksasyon işleminde sıklıkla kullanılan formaldehit, numunelerin çözünmesi sebebiyle uygulanamamış olup, %2.5 glutaraldehit ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ancak, numune özellikleri ve yüzey görünümleri değerlendirildiğinde daha iyi görseller almak için alternatif fiksasyon yöntemlerinin de denenmesi gerektiği veya daha iyi görseller alabilmek için

ileri hücre iskeleti boyama ve alternatif görüntüleme yöntemlerinin kullanılabileceği düşünülmektedir.

ALP aktivitesinin gözlemlenmesi için numunelerle inkübe edilen hücrelerin süpernatantları alınmış ve Fin Test ELISA Kiti ile analizlenmiştir. ALP ELISA Kit standart eğrisinden elde edilen grafik ile kontrol, PVDF, PVDF/PCL, PVDF/PCL/BAG ve PVDF/PCL1BAG numuneleri için ALP değerleri sırasıyla; 1.134, 23.61, 1.276, 21,382 ve 28.191 (ng/mL) olarak kaydedilmiş ve Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3 : Ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin ALP aktivitesi.

Numune Kodu	OD	ALP (ng/mL)
Kontrol	0,436	1,13
PVDF	0,753	23,61
PVD/PCL	0,438	1,27
PVDF/PCL/BAG	0,725	21,38
PVD/PCL/1B	0,817	28,19

14 günlük inkübasyon sonucu ALP aktivitesi sonucu incelendiğinde, tüm numuneler kontrolün çok üzerinde ALP varlığı göstermiştir. PVDF/PCL/1B kodlu numunenin en yüksek ALP değerinin kaydedildiği numune olduğu tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, hücre ALP aktivitesinin hücre proliferasyon testi ve floresan görselleri ile tutarlı olduğu söylenebilir.

4.4 Sonuçlar

Çalışmanın bu bölümünde NIPS yöntemi, bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin geliştirilmesinde başarıyla kullanılmıştır. Toz içeriğinin membran iskelelerinin fiziksel, mekanik ve biyolojik özellikleri üzerindeki etkileri sistematik olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, membran iskelelerin yoğun bir yüzey tabakasının altında birbirine bağlı homojen kesit gözeneklerine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, toz içeriğinin artırılması, şişme derecesini azaltırken, yüzey hidrofilitasını artırmıştır. Bununla birlikte, iskeleler üstün termal özellikler ve β -faz fraksiyonu göstermiştir. Mekanik özelliklerin iskeleler için görülen sınırlar içinde olduğu bulunmuştur. *In vitro* biyomineralizasyon değerlendirmeleri, iskelelerin yüzeylerinde apatit oluşum yeteneğini önemli ölçüde desteklediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, iskeleler sitotoksikite olmaksızın olumlu *in vitro* hücre canlılığı, çoğalması ve

bağlanması göstermiştir. Sonuç olarak, üretilen bor katkılı BAG/PVDF-PCL esaslı membran doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için uygun fizikokimyasal ve biyolojik performans sağlayan umut verici platformlar olarak hizmet edeceği öngörülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasının amacı, en genel çerçevede, kemik doku yenilenmesini destekleyecek özelliklere sahip bor katkılı BCP ya da BAG takviyeli PVDF ve PVDF-PCL esaslı membran formundaki doku iskelelerinin çözücü olmayan indüklenmiş faz ayrımı yöntemi ile üretimi ve kemik doku uygulamalarındaki etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu amaca yönelik olarak, çalışma üç bölümde incelenmiştir.

Tez çalışmasının ilk bölümünde, ıslak kimyasal yöntem ve ısıtma işlem prosedürleri içeren ardışık yöntem ile sentezlenen bor katkılı BCP tozlarının SEM ile belirlenen morfolojileri, farklı geometrik şekillere sahip toz aglomeralarının çok sayıda düzensiz partikülden oluştuğunu ortaya koymuştur. Bu partiküllerin ortalama boyutlarının 15 μm 'nin altında olduğu, gerçekleştirilen partikül boyut analizleri sonucu tespit edilmiştir. Değişen bor içeriği ile tozların morfolojileri ve ortalama partikül boyut dağılımlarında belirgin bir değişiklik gözlenmezken, bor içeriğinin artması tozların yoğunluk değerlerini arttırmıştır. XRD analizi, HA ve β -TCP'den oluşan BCP'nin varlığını doğrulamakla birlikte, bor katkı miktarına bağlı olarak piklerin tepe noktalarında kaymaların olduğu gözlenmiştir. Tozların PVDF'e dahil edilmesiyle çözücü olmayan indüklenmiş faz ayrımı yöntemi kullanılarak çok çeşitli özelliklere sahip membran doku iskeleleri üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Üretilen membran iskelelerin morfolojisi, PVDF esaslı membranların karakteristiği olan homojen yoğun yüzey katmanının altında birbirine bağlı farklı gözenek boyutlarına sahip bal peteği benzeri düzenli gözeneklerle karakterize edilmiştir. İskelelerin ortalama gözenek boyutu, tozların polimer matrise eklenmesiyle artış göstermiştir. FTIR spektrumları, PVDF, BCP ve borun karakteristik bantlarının varlığını doğrularken, bor ve BCP katkısı ile PVDF matrisinin yapısal simetrisinin şiddetlerinde değişiklikleri de ortaya koymuştur. Hücresel aktiviteyi önemli ölçüde etkileyen yüzey hidrofilitesi, iskelelerin su ve PBS ortamlarında gerçekleştirilen temas açısı analizleri ile ölçülmüştür. Tozların polimer matrise dahil edilmesiyle azalan temas açısı değerleri, katkı maddelerinin etkisini ortaya koymuştur. Ayrıca, su temas açısı ölçüm sonuçlarının PBS ortamındaki ölçüm sonuçlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonraki bölümlerinde temas açısı ölçümlerinin PBS ortamında

gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Hücre kültürü ortamının emilimini ve besin akışını kolaylaştırarak kemik büyümesini destekleyen iskelelerin fizyolojik ortamdaki şişme yeteneği, gerçekleştirilen şişme deneyleri ile tespit edilmiş olup, iskelelerin şişme oranının, artan toz içeriğiyle azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. İskelelerin implantasyondan yüksek *in vivo* mekanik yüklere dayanma etkinliklerinin en önemli belirleyicilerinden olan mekanik özellikleri, doğal kemiğin mekanik özellikleriyle uyumlu olup, polimer matristeki toz içeriğiyle değişmiştir. İskelelerin DSC analizleriyle belirlenen termal özellikleri, α ve β fazlarının erime davranışıyla ilişkili olan endotermik piklerin varlığını göstermekle birlikte, özellikle ağ. %1 ve ağ. %2 bor katkılı iskelelerde yalnızca β fazına ait endotermik pikin varlığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, membran üretim prosesinin, PVDF esaslı iskelelerin β fazının oluşumunu desteklediği ve iskelelerin β faz içeriğini arttırdığı belirlenmiştir. İskelelerin β faz içeriği, kristalizasyon değerleriyle oranlandığında, toplam kristalleşmede en yüksek β kristalleşme değerinin ağ. %0,5 bor katkılı numunede, en düşük β -kristalleşme değerinin ise saf PVDF numunesinde olduğu belirlenmiştir. İskelelerdeki mevcut α ve β kristal faz yapıları XRD ile gösterilmiştir. SBF içerisinde gerçekleştirilen *in vitro* biyoaktivite deneyi ile, iskelelerin yüzeylerinde kemik benzeri apatitlerin varlığı ve bu apatitlerin Ca ve P'den oluştuğu doğrulanmıştır. İskelelerin biyoyumumluluğunun bir göstergesi olan sitotoksosite olmaksızın arzu edilen hücre çoğalması sergilemesi, gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksosite testi ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar, bor katkılı BCP/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin üstün yapısal, termal ve mekanik özelliklerinin yanı sıra, biyolojik ortama uygun davranabilme yeteneğine sahip olduğunu doğrulamıştır.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, ilk bölümde gerçekleştirilen çalışmalar sonucu seçilen ağ. %1 bor katkılı BCP/PVDF esaslı iskelenin NIPS yöntemi ile -5, 0, 10 ve 20 °C olmak üzere farklı koagülasyon banyo sıcaklıklarında üretimleri gerçekleştirilmiş olup, önemli bir üretim parametresi olan koagülasyon banyo sıcaklığının iskelelerin özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Üretilen membran iskelelerin SEM ile incelenen yoğun yüzey katmanının altında, değişen banyo sıcaklığı ile farklı gözenek boyutlarına sahip sünger benzeri bir yapı ile karakterize edilen kesit morfolojisi sergilediği gözlenmiştir. Düşük banyo sıcaklıkları küçük gözeneklerin oluşmasına neden olurken, sıcaklığın artması ile özellikle 20 °C'de üretilen iskelenin en yüksek gözenek boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir.

İskelelerin PBS temas açısı ölçüm sonuçları, özellikle 10 °C ve 20 °C’de üretilen iskelelerin yüzey hidrofilikliğinin önemli ölçüde arttırdığını ortaya koymuştur. PVDF esaslı iskelelerin α ve β kristal faz yapıları XRD ile belirlenmiştir. FTIR spektrumlarında, daha yüksek koagülasyon banyo sıcaklıklarında hazırlanan iskelelerde α -fazına ilişkin piklerin baskılandığı, β fazını temsil eden piklerin ise net bir şekilde görüldüğü ortaya çıkmıştır. Oluşan β fazının içeriğinin, banyo sıcaklığı arttıkça yükseldiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, proses parametrelerinin, özellikle yüksek banyo sıcaklıklarının β fazı oluşumunu desteklediğini doğrulamıştır. İskelelerin DSC ile belirlenen termal davranışı, α ve β fazlarına ilişkin endotermilerin varlığını göstermiştir. Ancak, hesaplanan toplam kristalleşme değerleri, değişen banyo sıcaklıklarıyla çok fazla farklılık göstermemiştir. Ayrıca, iskelelerin erime sıcaklıklarının insan vücut sıcaklığından önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasının üçüncü bölümünde, CaP esaslı biyoseramiklere bir alternatif olarak bor katkılı BAG tozları, sol-jel ve ısıtım işlem proseslerini içeren ardışık yöntem ile sentezlenmiştir. Sentezlenen tozların morfolojileri SEM ile belirlenmiş ve BAG tozundaki yarı küresel kristalitlerin sinterlenmesinin bir sonucu olarak oluşan çok sayıda düzensiz şekilli aglomeranın varlığı gözlenmiştir. Oluşan mikropartikül aglomeraların parçacık boyutunun, içerdiği bor miktarına göre 27 ile 31 μm arasında değiştiği tespit edilmiştir. Tozların bor oranı arttıkça yoğunlukları azalmıştır. XRD analizi, BAG fazının oluşumunu doğrulamakla birlikte, ikincil faz olarak larnit fazının varlığı da görülmüştür. PVDF’e dahil edilen tozlar, NIPS yöntemi kullanılarak bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskeleleri üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Üretilen iskelelerin SEM ile incelenen morfolojisi, Bölüm 2.3.2.1 ve 3.3.1.1’de olduğu gibi yoğun bir yüzey katmanı ve düzenli kesitsel gözenek yapısı ile karakterize edilen asimetric bir morfoloji göstermiştir. Bu gözeneklerin boyutu polimer matristeki toz içeriği ile değişmiş olup, en yüksek gözenek boyutunun ağ. %1 bor katkılı BAG/PVDF esaslı iskelede olduğu tespit edilmiştir. İskelelerin üst ve alt yüzey hidrofilisteleri PBS içerisinde gerçekleştirilen temas açısı ölçümleri ile tespit edilmiş olup, alt yüzeylerinin üst yüzeylere kıyasla daha düşük temas açısı değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, polimer matrise toz eklenmesi iskelelerin temas açısı değerlerini göreceli olarak düşürerek ıslanabilirlikte bir artış sağlamıştır. Bor katkılı BAG/PVDF esaslı membran doku iskelelerinin kristalin faz yapıları XRD ile karakterize edilmiş,

kimyasal bağları ve moleküler yapıları FTIR ile belirlenerek tozların eklenmesiyle tüm pik yoğunluklarında bir azalma olduğu görülmüştür. Üretilen iskelelerin DSC kullanılarak belirlenen termal davranışı XRD ve FTIR sonuçlarıyla tutarlı olup, bu sonuçlarda, α -faz pikleri gözlenmezken, β -fazına ait pikler açıkça görülmüştür. Ayrıca, P/BAG/2B numunesine ilişkin olarak piezoelektrik özelliklere sahip bir diğer faz olan γ -PVDF'in varlığı da yapıda tespit edilmiştir. Üretilen membran iskelelerin mekanik performansı gerilim altında değerlendirilmiş, toz içeriğine bağlı olarak mekanik özelliklerinde bir miktar düşüş olduğu gözlenmiştir. Ancak, tüm iskelelerin doğal kemiğe benzer mekanik dayanıma sahip olduğu belirlenmiştir. İskelelerin SBF içerisinde değerlendirilen biyoaktivitesi, *in vitro* apatit büyüme sürecinin karakteristiği olan karnabahar benzeri küresel bir morfolojiye sahip olduğunu, ve bu apatitlerin Ca ve P'den oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca, iskeleler sitotoksikite olmaksızın olumlu *in vitro* hücre canlılığı, çoğalması ve bağlanması göstermiştir.

Sunulan tez çalışması, bor katkılı BCP'nin PVDF ile, bor katkılı BAG'ın ise PVDF ve PVDF-PCL ile birlikte kullanımının membran formundaki doku iskelelerinin kemik doku oluşturma potansiyellerinin çeşitli *in vitro* testler ile detaylı olarak incelenmesi ile tamamlanmıştır. Özellikle bor katkılı BAG'ın PVDF-PCL esaslı kompozit iskelelere yapısal, mekanik ve biyolojik olarak destek verebilecek bir doku iskelesi adayı olabileceği değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında önemli bulgular elde edilmekle birlikte, daha detaylı analizler ile sonuçlar desteklenebilir. Gelecek çalışmalar için bazı öneriler aşağıda sıralanmıştır:

- Bor iyonlarının salımı çalışılabilir.
- Piezoelektrik etki, kapsamlı testlerle daha detaylı incelenebilir.
- Farklı membran iskele morfolojileri elde etmek için koagülasyon banyosunun bileşimi ve ortamı değiştirilebilir.
- İleri *in vitro* ve *in vivo* testler ile üretilen membran iskelelerin biyolojik ortamlardaki etkinliği daha detaylı incelenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Adithya, S. P., Sidharthan, D. S., Abhinandan, R., Balagangadharan, K. & Selvamurugan, N.** (2020). Nanosheets-incorporated bio-composites containing natural and synthetic polymers/ceramics for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1960–1972.
- [2] **Cao, S., Zhao, Y., Hu, Y., Zou, L., & Chen, J.** (2020). New perspectives: In-situ tissue engineering for bone repair scaffold. *Composites Part B: Engineering*, 202, 108445.
- [3] **Srinath, P., Abdul Azeem, P., & Venugopal Reddy, K.** (2020). Review on calcium silicate-based bioceramics in bone tissue engineering,” *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 17(5), 2450-2464.
- [4] **Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., & Uludağ, H.** (2018). Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 80, 1-30.
- [5] **Kjl, B.** (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21, 2347-2359.
- [6] **Vacanti, J. P., & Langer, R.** (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet*, 354, 32-34.
- [7] **Winkler, T., Sass, F. A., Duda, G. N., & Schmidt-Bleek, K.** (2018). A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone & Joint Research*, 7(3), 232-243.
- [8] **Shekhawat, D., Singh, A., Banerjee, M. K., Singh, T., & Patnaik, A.** (2021). Bioceramic composites for orthopaedic applications: A comprehensive review of mechanical, biological, and microstructural properties. *Ceramics International*, 47(3), 3013-3030.
- [9] **Yasuda, I.** (1954). On the piezoelectric activity of bone. *J Jpn Orthop Surg Soc*, 28(3), 267.
- [10] **Gong, T., Li, T., Meng, L., Chen, Y., Wu, T., Zhou, J., ... & Wang, Z.** (2022). Fabrication of piezoelectric Ca-P-Si-doped PVDF scaffold by phase-separation-hydration: Material characterization, in vitro biocompatibility and osteoblast redifferentiation. *Ceramics International*, 48(5), 6461-6469.
- [11] **Karimi, S., Ghaee, A., & Barzin, J.** (2019). Preparation and characterization of a piezoelectric poly (vinylidene fluoride)/nanohydroxyapatite scaffold

capable of naproxen delivery. *European Polymer Journal*, 112, 442-451.

- [12] **Martins, P., Lopes, A. C., & Lanceros-Mendez, S.** (2014). Electroactive phases of poly (vinylidene fluoride): Determination, processing and applications. *Progress in Polymer Science*, 39(4), 683-706.
- [13] **Kabir, E., Khatun, M., Nasrin, L., Raihan, M. J., & Rahman, M.** (2017). Pure β -phase formation in polyvinylidene fluoride (PVDF)-carbon nanotube composites. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 50(16), 163002.
- [14] **Abzan, N., Kharaziha, M., & Labbaf, S.** (2019). Development of three-dimensional piezoelectric polyvinylidene fluoride-graphene oxide scaffold by non-solvent induced phase separation method for nerve tissue engineering. *Materials & Design*, 167, 107636.
- [15] **More, N., & Kapusetti, G.** (2017). Piezoelectric material—a promising approach for bone and cartilage regeneration. *Medical Hypotheses*, 108, 10-16.
- [16] **Li, Y., Liao, C., & Tjong, S. C.** (2019). Electrospun polyvinylidene fluoride-based fibrous scaffolds with piezoelectric characteristics for bone and neural tissue engineering. *Nanomaterials*, 9(7), 952.
- [17] **Przekora, A.** (2019). Current trends in fabrication of biomaterials for bone and cartilage regeneration: Materials modifications and biophysical stimulations. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 435.
- [18] **Szewczyk, P. K., Metwally, S., Karbowniczek, J. E., Marzec, M. M., Stodolak-Zych, E., Gruszczyński, A., ... & Stachewicz, U.** (2018). Surface-potential-controlled cell proliferation and collagen mineralization on electrospun polyvinylidene fluoride (PVDF) fiber scaffolds for bone regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(2), 582-593.
- [19] **Hutmacher, D. W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K. W., Teoh, S. H., & Tan, K. C.** (2001). Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *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*, 55(2), 203-216.
- [20] **Roosa, S. M. M., Kemppainen, J. M., Moffitt, E. N., Krebsbach, P. H., & Hollister, S. J.** (2010). The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *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*, 92(1), 359-368.
- [21] **Hollister, S. J., Lin, C. Y., Saito, E., Lin, C. Y., Schek, R. D., Taboas, J. M., ... & Krebsbach, P. H.** (2005). Engineering craniofacial scaffolds. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 8(3), 162-173.
- [22] **Zhang, W., Ullah, I., Shi, L., Zhang, Y., Ou, H., Zhou, J., ... & Li, W.** (2019). Fabrication and characterization of porous polycaprolactone scaffold

via extrusion-based cryogenic 3D printing for tissue engineering. *Materials & Design*, 180, 107946.

- [23] **Hoque, M. E., Hutmacher, D. W., Feng, W., Li, S., Huang, M. H., Vert, M., & Wong, Y. S.** (2005). Fabrication using a rapid prototyping system and in vitro characterization of PEG-PCL-PLA scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16(12), 1595-1610.
- [24] **Erdemli, O., Captug, O., Bilgili, H., Orhan, D., Tezcaner, A., & Keskin, D.** (2010). In vitro and in vivo evaluation of the effects of demineralized bone matrix or calcium sulfate addition to polycaprolactone–bioglass composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 295-308.
- [25] **Nyberg, E., Rindone, A., Dorafshar, A., & Grayson, W. L.** (2017). Comparison of 3D-printed poly- ϵ -caprolactone scaffolds functionalized with tricalcium phosphate, hydroxyapatite, bio-oss, or decellularized bone matrix. *Tissue Engineering Part A*, 23(11-12), 503-514.
- [26] **Wu, H., Li, Z., Jiang, W., Lin, K., Zhao, C., & Wang, X.** (2024). 3D-printed porous polyether-ether-ketone composite scaffolds for better osteogenic activity. *Materials Letters*, 373, 137100.
- [27] **Hao, J., Yuan, M., & Deng, X.** (2002). Biodegradable and biocompatible nanocomposites of poly (ϵ -caprolactone) with hydroxyapatite nanocrystals: Thermal and mechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(3), 676-683.
- [28] **Lam, C. X., Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Woodruff, M. A., & Teoh, S. H.** (2009). Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *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*, 90(3), 906-919.
- [29] **Lin, W. J., Flanagan, D. R., & Linhardt, R. J.** (1999). A novel fabrication of poly (ϵ -caprolactone) microspheres from blends of poly (ϵ -caprolactone) and poly (ethylene glycol) s. *Polymer*, 40(7), 1731-1735.
- [30] **Duman, Ş., & Bulut, B.** (2021). Effect of akermanite powders on mechanical properties and bioactivity of chitosan-based scaffolds produced by 3D-bioprinting. *Ceramics International*, 47(10), 13912-13921.
- [31] **Bulut, B., & Duman, Ş.** (2022). Evaluation of mechanical behavior, bioactivity, and cytotoxicity of chitosan/akermanite-TiO₂ 3D-printed scaffolds for bone tissue applications. *Ceramics International*, 48(15), 21378-21388.
- [32] **Mutlu, B., Çaylak, S., & Duman, Ş.** (2022). Incorporation of cerium oxide into hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds for bone repair. *Processing and Application of Ceramics*, 16(3), 207-217.
- [33] **Agyemang, F. O., Sheikh, F. A., Appiah-Ntiamoah, R., Chandradass, J., & Kim, H.** (2015). Synthesis and characterization of poly (vinylidene

fluoride)–calcium phosphate composite for potential tissue engineering applications. *Ceramics International*, 41(5), 7066-7072.

- [34] **Silva, L. M., Rosso, J. M., Bonadio, T. G. M., Silva, D. M., Dias, G. S., Weinand, W. R., ... & Freitas, V. F.** (2018). On mechanical properties and bioactivity of PVDF-BCP composites. *Cerâmica*, 64(371), 359-366.
- [35] **Yang, X., & Wang, Z.** (1998). Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity. *Journal of Materials Chemistry*, 8(10), 2233-2237.
- [36] **Kim, B., Ventura, R., & Lee, B. T.** (2018). Functionalization of porous BCP scaffold by generating cell-derived extracellular matrix from rat bone marrow stem cells culture for bone tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2), e1256-e1267.
- [37] **Jodati, H., Tezcaner, A., Alshemary, A. Z., Şahin, V., & Evis, Z.** (2022). Effects of the doping concentration of boron on physicochemical, mechanical, and biological properties of hydroxyapatite. *Ceramics International*, 48(16), 22743-22758.
- [38] **Jodati, H., Yilmaz, B., & Evis, Z.** (2020). Calcium zirconium silicate (baghdadite) ceramic as a biomaterial. *Ceramics International*, 46(14), 21902-21909.
- [39] **Najafinezhad, A., Abdollahi, M., Ghayour, H., Soheily, A., Chami, A., & Khandan, A.** (2017). A comparative study on the synthesis mechanism, bioactivity and mechanical properties of three silicate bioceramics. *Materials Science and Engineering: C*, 72, 259-267.
- [40] **Schumacher, T. C., Volkmann, E., Yilmaz, R., Wolf, A., Treccani, L., & Rezwan, K.** (2014). Mechanical evaluation of calcium-zirconium-silicate (baghdadite) obtained by a direct solid-state synthesis route. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 34, 294-301.
- [41] **Hafezi-Ardakani, M., Moztarzadeh, F., Rabiee, M., & Talebi, A. R.** (2011). Synthesis and characterization of nanocrystalline merwinite ($\text{Ca}_3\text{Mg}(\text{SiO}_4)_2$) via sol–gel method. *Ceramics International*, 37(1), 175-180.
- [42] **Abbasian, V., Emadi, R., & Kharaziha, M.** (2020). Biomimetic nylon 6-baghdadite nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110549.
- [43] **Ceylan, M. N., Akdas, S., & Yazihan, N.** (2021). Is zinc an important trace element on bone-related diseases and complications? A meta-analysis and systematic review from serum level, dietary intake, and supplementation aspects. *Biological Trace Element Research*, 199(2), 535-549.
- [44] **Gaffney-Stomberg, E.** (2019). The impact of trace minerals on bone metabolism. *Biological Trace Element Research*, 188(1), 26-34.
- [45] **Danilchenko, S. N., Rogulsky, Y. V., Kulik, A. N., & Kalinkevich, A. N.** (2019). Determination of labile and structurally bound trace elements

of bone tissue by atomic absorption spectrometry. *Journal of Applied Spectroscopy*, 86, 264-269.

- [46] **Maciejewska, K., Drzazga, Z., & Kaszuba, M.** (2014). Role of trace elements (Zn, Sr, Fe) in bone development: Energy dispersive X-ray fluorescence study of rat bone and tooth tissue. *BioFactors*, 40(4), 425-435.
- [47] **Shirazi, S. F. S., Gharehkhani, S., Metselaar, H. S. C., Nasiri-Tabrizi, B., Yarmand, H., Ahmadi, M., & Osman, N. A. A.** (2016). Ion size, loading, and charge determine the mechanical properties, surface apatite, and cell growth of silver and tantalum doped calcium silicate. *RSC Advances*, 6(1), 190-200.
- [48] **Pizzorno, L.** (2015). Nothing boring about boron. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, 14(4), 35.
- [49] **Albayrak, O.** (2016). Structural and mechanical characterization of boron doped biphasic calcium phosphate produced by wet chemical method and subsequent thermal treatment. *Materials Characterization*, 113, 82-89.
- [50] **Rondanelli, M., Faliva, M. A., Peroni, G., Infantino, V., Gasparri, C., Iannello, G., ... & Tartara, A.** (2020). Pivotal role of boron supplementation on bone health: A narrative review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62, 126577.
- [51] **Hakki, S. S., Bozkurt, B. S., & Hakki, E. E.** (2010). Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(4), 243-250.
- [52] **Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., ... & zhu Lu, C.** (2011). Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biological Trace Element Research*, 144, 306-315.
- [53] **Gümüşderelioğlu, M., Tunçay, E. Ö., Kaynak, G., Demirtaş, T. T., & Aydın, S. T.** (2015). Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120-128.
- [54] **Badali, Y., Koçyiğit, S., Aytimur, A., Altındal, Ş., & Uslu, İ.** (2019). Synthesis of boron and rare earth stabilized graphene doped polyvinylidene fluoride (PVDF) nanocomposite piezoelectric materials. *Polymer Composites*, 40(9), 3623-3633.
- [55] **Abzan, N., Kharaziha, M., Labbaf, S., & Saeidi, N.** (2018). Modulation of the mechanical, physical and chemical properties of polyvinylidene fluoride scaffold via non-solvent induced phase separation process for nerve tissue engineering applications. *European Polymer Journal*, 104, 115-127.
- [56] **Teixeira, J., Cardoso, V. F., Botelho, G., Morão, A. M., Nunes-Pereira, J., & Lanceros-Mendez, S.** (2021). Effect of polymer dissolution temperature and conditioning time on the morphological and physicochemical characteristics of poly(vinylidene fluoride)

membranes prepared by non-solvent induced phase separation. *Polymers*, 13(23), 4062.

- [57] **Cheng, L. P.** (1999). Effect of temperature on the formation of microporous PVDF membranes by precipitation from 1-octanol/DMF/PVDF and water/DMF/PVDF systems. *Macromolecules*, 32(20), 6668-6674.
- [58] **Barrère, F., van Blitterswijk, C. A., & de Groot, K.** (2006). Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International Journal of Nanomedicine*, 1(3), 317-332.
- [59] **Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E.** (2004). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier.
- [60] **Wang, X., Xu, S., Zhou, S., Xu, W., Leary, M., Choong, P., ... & Xie, Y. M.** (2016). Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials*, 83, 127-141.
- [61] **Martin, R. B., Burr, D. B., Sharkey, N. A., & Fyhrie, D. P.** (1998). *Skeletal tissue mechanics* (190). New York: Springer.
- [62] **Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L.** (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4(8), 743-765.
- [63] **Mescher, A. L.** (2018). *Junqueira's basic histology: text and atlas*. New York: McGraw Hill.
- [64] **Irmak, G.** (2013). *β -Estradiol Yüklü Doku İskeleleri ile In-Vitro Kemik Doku Mühendisliği*. (Yüksek lisans tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- [65] **Akay, M. T.** (2006). *Genel histoloji*. Palme Yayıncılık.
- [66] **Murugan, R., & Ramakrishna, S.** (2005). Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*, 65(15-16), 2385-2406.
- [67] **Topaloğlu, U., Ketani, M. A., & Saruhan, B. G.** (2017). Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1), 62-71.
- [68] **Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S.** (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, 2015(1), 421746.
- [69] **Mundy, G. R.** (1993). Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 8(S2), S505-S510.
- [70] **Gartner, L. P., & Hiatt, J. L.** (2006). *Color textbook of histology e-book*. Elsevier Health Sciences.
- [71] **Ağaçayak, K. S.** (2011). *Rat kalvaryumunda oluşturulan kritik boyut defektlerinde mezenkimal kök hücreleri, bifazik kalsiyum fosfat seramikleri ve trombositten zengin plazmanın kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinin histolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırılması*. (Doktora tezi). Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.

- [72] Miloro, M., Ghali, G.E., Larsen, P.E. & Waite, P.D. (2004). *Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery* (1)37. London: BC Decker.
- [73] Kume, K., Satomura, K., Nishisho, S., Kitaoka, E., Yamanouchi, K., Tobiume, S., & Nagayama, M. (2002). Potential role of leptin in endochondral ossification. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(2), 159-169.
- [74] Radi, Z. A., & Khan, N. K. (2005). Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon, and ligament healing. *Inflammation Research*, 54, 358-366.
- [75] Kohli, N., Ho, S., Brown, S. J., Sawadkar, P., Sharma, V., Snow, M., & García-Gareta, E. (2018). Bone remodelling in vitro: Where are we headed?:-A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials in vitro. *Bone*, 110, 38-46.
- [76] 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.
- [77] Bulut, B. (2019). *Kemik doku uygulamaları için TiO₂/akermanit katkılı kitosan doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu* (Yüksek lisans tezi). Bursa Teknik Üniversitesi, Bursa.
- [78] Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., & Kenny, J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, 95(11), 2126-2146.
- [79] Mala, R., & Celsia, A. R. (2018). Bioceramics in orthopaedics: A review. *Fundamental Biomaterials: Ceramics*, 195-221.
- [80] Ghalia, M. A., & Dahman, Y. (2016). Advanced nanobiomaterials in tissue engineering: Synthesis, properties, and applications. In *Nanobiomaterials in soft tissue engineering* (pp. 141-172). William Andrew Publishing.
- [81] Güven, Ş. (2014). Biyouyumluluk ve biyomalzemelerin seçimi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2(3), 303-311.
- [82] Koons, G. L., Diba, M., & Mikos, A. G. (2020). Materials design for bone-tissue engineering. *Nature Reviews Materials*, 5(8), 584-603.
- [83] Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., & Chua, C. K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering*, 7(6), 679-689.
- [84] Swetha, M., Sahithi, K., Moorthi, A., Srinivasan, N., Ramasamy, K., & Selvamurugan, N. (2010). Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), 1-4.
- [85] Wan, C., & Bowen, C. R. (2017). Multiscale-structuring of polyvinylidene fluoride for energy harvesting: the impact of molecular-, micro-and macro-structure. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(7), 3091-3128.

- [86] Mishra, S., Unnikrishnan, L., Nayak, S. K., & Mohanty, S. (2019). Advances in piezoelectric polymer composites for energy harvesting applications: a systematic review. *Macromolecular Materials and Engineering*, 304(1), 1800463.
- [87] Ruan, L., Yao, X., Chang, Y., Zhou, L., Qin, G., & Zhang, X. (2018). Properties and applications of the β phase poly (vinylidene fluoride). *Polymers*, 10(3), 228.
- [88] Papež, N., Pisarenko, T., Ščasnovič, E., Sobola, D., Țălu, Ș., Dallaev, R., ... & Sedlák, P. (2022). A brief introduction and current state of polyvinylidene fluoride as an energy harvester. *Coatings*, 12(10), 1429.
- [89] Rodrigues, M. T., Gomes, M. E., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2008). β -PVDF membranes induce cellular proliferation and differentiation in static and dynamic conditions. *Materials Science Forum* (587)72-76. Trans Tech Publications Ltd.
- [90] Ribeiro, C., Pärssinen, J., Sencadas, V., Correia, V., Miettinen, S., Hytönen, V. P., & Lanceros-Méndez, S. (2015). Dynamic piezoelectric stimulation enhances osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(6), 2172-2175.
- [91] Damaraju, S. M., Shen, Y., Elele, E., Khusid, B., Eshghinejad, A., Li, J., ... & Arinzeh, T. L. (2017). Three-dimensional piezoelectric fibrous scaffolds selectively promote mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials*, 149, 51-62.
- [92] Abazari, M. F., Soleimanifar, F., Enderami, S. E., Nematzadeh, M., Nasiri, N., Nejati, F., ... & Ghoraieian, P. (2019). Incorporated-bFGF polycaprolactone/polyvinylidene fluoride nanocomposite scaffold promotes human induced pluripotent stem cells osteogenic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 16750-16759.
- [93] Peidavosi, N., Azami, M., Beheshtizadeh, N., & Ramazani Saadatabadi, A. (2022). Piezoelectric conductive electrospun nanocomposite PCL/Polyaniline/Barium Titanate scaffold for tissue engineering applications. *Scientific Reports*, 12(1), 20828.
- [94] Arefpour, A., Kasiri-Asgarani, M., Monshi, A., Karbasi, S., Doostmohammadi, A., & Rostami, S. (2021). In vitro bioactivity of baghdadite-coated PCL-graphene nanocomposite scaffolds: mechanism of baghdadite and apatite formation. *Materials Technology*, 36(13), 761-770.
- [95] Bagherzadeh, E., Sherafat, Z., Zebarjad, S. M., Khodaei, A., & Yavari, S. A. (2023). Stimuli-responsive piezoelectricity in electrospun polycaprolactone (PCL)/Polyvinylidene fluoride (PVDF) fibrous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Materials Research and Technology*, 23, 379-390.
- [96] Dwivedi, R., Kumar, S., Pandey, R., Mahajan, A., Nandana, D., Katti, D. S., & Mehrotra, D. (2020). Polycaprolactone as biomaterial for bone

scaffolds: Review of literature. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 10(1), 381-388.

- [97] **Andini, R., Sulaiman, M. I., Umam, A. H., Olivia, M., & Endres, H. J.** (2021). Biopolymer nanocomposites: their mechanical, thermal, and gas barrier properties for food packaging. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (667)012067 IOP Publishing.
- [98] **Mutlu, B., Demirci, F., & Duman, Ş.** (2024). Influence of boron incorporated biphasic calcium phosphate on mechanical, thermal, and biological properties of poly (vinylidene fluoride) membrane scaffold. *Journal of the American Ceramic Society*, 107(11), 7274-7288.
- [99] **Gul, H., Khan, M., & Khan, A. S.** (2020). Bioceramics: Types and clinical applications. In *Handbook of ionic substituted hydroxyapatites*. 53-83. Woodhead Publishing.
- [100] **Dorozhkin, S. V.** (2019). Functionalized calcium orthophosphates (CaPO₄) and their biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(47), 7471-7489.
- [101] **Kucko, N. W., Herber, R. P., Leeuwenburgh, S. C., & Jansen, J. A.** (2019). Calcium phosphate bioceramics and cements. *Principles of Regenerative Medicine*. 591-611. Academic Press.
- [102] **Mitra, J., Tripathi, G., Sharma, A., & Basu, B.** (2013). Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response. *Rsc Advances*, 3(28), 11073-11094.
- [103] **Ramay, H. R., & Zhang, M.** (2004). Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Biomaterials*, 25(21), 5171-5180.
- [104] **Ebrahimi, M., Botelho, M. G., & Dorozhkin, S. V.** (2017). Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1293-1312.
- [105] **Ananth, K. P., Guo, B., Zhang, C., Wang, W., Zhou, P., & Bai, J.** (2020). Investigation of biphasic calcium phosphate (BCp)/polyvinylpyrrolidone (PVp)/graphene oxide (GO) composite for biomedical implants. *Ceramics International*, 46(15), 24413-24423.
- [106] **Bouler, J. M., Pilet, P., Gauthier, O., & Verron, E.** (2017). Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomaterialia*, 53, 1-12.
- [107] **Zhu, Q., Ablikim, Z., Chen, T., Cai, Q., Xia, J., Jiang, D., & Wang, S.** (2017). The preparation and characterization of HA/β-TCP biphasic ceramics from fish bones. *Ceramics International*, 43(15), 12213-12220.
- [108] **Piccirillo, C., Silva, M. F., Pullar, R. C., Da Cruz, I. B., Jorge, R., Pintado, M. M. E., & Castro, P. M.** (2013). Extraction and characterisation of apatite-and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), 103-110.

- [109] **Zerankeshi, M. M., Mofakhami, S., & Salahinejad, E.** (2022). 3D porous HA/TCP composite scaffolds for bone tissue engineering. *Ceramics International*, 48(16), 22647-22663.
- [110] **Marques, C. F., Olhero, S., Abrantes, J. C. C., Marote, A., Ferreira, S., Vieira, S. I., & Ferreira, J. M.** (2017). Biocompatibility and antimicrobial activity of biphasic calcium phosphate powders doped with metal ions for regenerative medicine. *Ceramics International*, 43(17), 15719-15728.
- [111] **Çeper, B.** (2021). *Metal katkılı bifazik kalsiyum fosfat/kitosan esaslı doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu* (Yüksek lisans tezi). Bursa Teknik Üniversitesi, Bursa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü).
- [112] **Chen, Y., Kawazoe, N., & Chen, G.** (2018). Preparation of dexamethasone-loaded biphasic calcium phosphate nanoparticles/collagen porous composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 67, 341-353.
- [113] **Thuaksuban, N., Pannak, R., Boonyaphiphat, P., & Monmaturapoj, N.** (2018). In vivo biocompatibility and degradation of novel Polycaprolactone-Biphasic Calcium phosphate scaffolds used as a bone substitute. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 29(2), 253-267.
- [114] **Du, Z., Zhao, Z., Liu, H., Liu, X., Zhang, X., Huang, Y., ... & Yang, X.** (2020). Macroporous scaffolds developed from CaSiO₃ nanofibers regulating bone regeneration via controlled calcination. *Materials Science and Engineering: C*, 113, 111005.
- [115] **Peng, X. Y., Hu, M., Liao, F., Yang, F., Ke, Q. F., Guo, Y. P., & Zhu, Z. H.** (2019). La-Doped mesoporous calcium silicate/chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials science*, 7(4), 1565-1573.
- [116] **Forni, M., Bernardini, C., Zamparini, F., Zannoni, A., Salaroli, R., Ventrella, D., ... & Gandolfi, M. G.** (2020). Vascular wall–mesenchymal stem cells differentiation on 3D biodegradable highly porous CaSi-DCPD doped Poly (α -hydroxy) acids scaffolds for bone regeneration. *Nanomaterials*, 10(2), 243.
- [117] **Mohammadi, H., Hafezi, M., Nezafati, N., Heasarki, S., Nadernezhad, A., Ghazanfari, S. M. H., & Sepantafar, M.** (2014). Bioinorganics in bioactive calcium silicate ceramics for bone tissue repair: bioactivity and biological properties. *Journal of Ceramic Science and Technology*, 5(1), 1-12.
- [118] **Sadeghzade, S., Emadi, R., & Labbaf, S.** (2016). Formation mechanism of nano-hardystonite powder prepared by mechanochemical synthesis. *Advanced Powder Technology*, 27(5), 2238-2244.
- [119] **Wu, C., Ramaswamy, Y., Soeparto, A., & Zreiqat, H.** (2008). Incorporation of titanium into calcium silicate improved their chemical stability and biological properties. *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*, 86(2), 402-410.

- [120] **Gheisari, H.** (2020). In Vitro Behavior of a Novel Nanostructure Hardystonite/Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds (HT/BCPS); Evaluation and Investigation. *Journal of Nanoanalysis*.
- [121] **Luo, T., Wu, C., & Zhang, Y.** (2012). The in vivo osteogenesis of Mg or Zr-modified silicate-based bioceramic spheres. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(9), 2269-2277.
- [122] **Wu, C., Ramaswamy, Y., Chang, J., Woods, J., Chen, Y., & Zreiqat, H.** (2008). The effect of Zn contents on phase composition, chemical stability and cellular bioactivity in Zn–Ca–Si system ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 87(2), 346-353.
- [123] **Guerreiro-Tanomaru, J. M., Trindade-Junior, A., Cesar Costa, B., da Silva, G. F., Drullis Cifali, L., Basso Bernardi, M. I., & Tanomaru-Filho, M.** (2014). Effect of Zirconium Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles on Physicochemical Properties and Antibiofilm Activity of a Calcium Silicate-Based Material. *The Scientific World Journal*, 2014(1), 975213.
- [124] **Shemshad, S., Kamali, S., Khavandi, A., & Azari, S.** (2019). Synthesis, characterization and in-vitro behavior of natural chitosan-hydroxyapatite-diopside nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(9), 516-526.
- [125] **Rafiee, N., Karbasi, S., Nourbakhsh, A. A., & Amini, K.** (2022). Natural hydroxyapatite/diopside nanocomposite scaffold for bone tissue engineering applications: physical, mechanical, bioactivity and biodegradation evaluation. *Materials Technology*, 37(1), 36-48.
- [126] **Jodati, H.** (2023). 3-dimensional boron-doped hydroxyapatite/baghdadite porous scaffolds for bone tissue engineering. (Doktora tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- [127] **Askari, E., Naghib, S. M., Seyfoori, A., Javidi, M. A., & Ansari, A. M.** (2022). Highly bioactive Akermanite-Monticellite nanocomposites for bone tissue engineering: a tunable three-dimensional biological study. *Journal of Materials Research and Technology*, 20, 4066-4076.
- [128] **Ramaswamy, Y., Wu, C., Van Hummel, A., Combes, V., Grau, G., & Zreiqat, H.** (2008). The responses of osteoblasts, osteoclasts and endothelial cells to zirconium modified calcium-silicate-based ceramic. *Biomaterials*, 29(33), 4392-4402.
- [129] **Arefpour, A., Kasiri-Asgarani, M., Monshi, A., Karbasi, S., & Doostmohammadi, A.** (2020). Baghdadite/Polycaprolactone nanocomposite scaffolds: preparation, characterisation, and in vitro biological responses of human osteoblast-like cells (Saos-2 cell line). *Materials Technology*, 35(7), 421-432.
- [130] **Bakhsheshi-Rad, H. R., Hamzah, E., Ismail, A. F., Aziz, M., Hadisi, Z., Kashefian, M., & Najafinezhad, A.** (2017). Novel nanostructured

baghdadite-vancomycin scaffolds: in-vitro drug release, antibacterial activity and biocompatibility. *Materials Letters*, 209, 369-372.

- [131] **Samani, D. A., Doostmohammadi, A., Nilforoushan, M. R., & Nazari, H.** (2019). Electrospun polycaprolactone/graphene/baghdadite composite nanofibres with improved mechanical and biological properties. *Fibers and Polymers*, 20, 982-990.
- [132] **Sadeghzade, S., Emadi, R., Tavangarian, F., & Doostmohammadi, A.** (2020). In vitro evaluation of diopside/baghdadite bioceramic scaffolds modified by polycaprolactone fumarate polymer coating. *Materials Science and Engineering: C*, 106, 110176.
- [133] **Sadreddini, S., Jodati, H., Evis, Z., & Keskin, D.** (2023). Novel barium-doped-baghdadite incorporated PHBV-PCL composite fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 148, 106185.
- [134] **Roohani-Esfahani, S. I., Dunstan, C. R., Davies, B., Pearce, S., Williams, R., & Zreiqat, H.** (2012). Repairing a critical-sized bone defect with highly porous modified and unmodified baghdadite scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 8(11), 4162-4172.
- [135] **Li, J. J., Roohani-Esfahani, S. I., Dunstan, C. R., Quach, T., Steck, R., Saifzadeh, S., ... & Zreiqat, H.** (2016). Efficacy of novel synthetic bone substitutes in the reconstruction of large segmental bone defects in sheep tibiae. *Biomedical Materials*, 11(1), 015016.
- [136] **Li, J. J., Akey, A., Dunstan, C. R., Vielericher, M., Friedrich, O., Bell, D. C., & Zreiqat, H.** (2018). Effects of material–tissue interactions on bone regeneration outcomes using baghdadite implants in a large animal model. *Advanced Healthcare Materials*, 7(15), 1800218.
- [137] **Kannan, S., Ventura, J. M. G., & Ferreira, J. M. F.** (2007). Synthesis and thermal stability of potassium substituted hydroxyapatites and hydroxyapatite/ β -tricalciumphosphate mixtures. *Ceramics International*, 33(8), 1489-1494.
- [138] **Šupová, M.** (2015). Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceramics International*, 41(8), 9203-9231.
- [139] **Farzadi, A., Bakhshi, F., Solati-Hashjin, M., Asadi-Eydivand, M., & abu Osman, N. A.** (2014). Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. *Ceramics International*, 40(4), 6021-6029.
- [140] **Fahami, A., Beall, G. W., & Betancourt, T.** (2016). Synthesis, bioactivity and zeta potential investigations of chlorine and fluorine substituted hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 78-85.
- [141] **Chen, Z., Liu, Y., Mao, L., Gong, L., Sun, W., & Feng, L.** (2018). Effect of cation doping on the structure of hydroxyapatite and the mechanism of defluorination. *Ceramics International*, 44(6), 6002-6009.
- [142] **Namdar, A., & Salahinejad, E.** (2023). Advances in ion-doping of Ca-Mg silicate bioceramics for bone tissue engineering. *Coordination Chemistry Reviews*, 478, 215001.

- [143] **Mohapatra, B., & Rautray, T. R.** (2020). Strontium-substituted biphasic calcium phosphate scaffold for orthopedic applications. *Journal of the Korean Ceramic Society*, 57, 392-400.
- [144] **Lu, T., Li, G., Zhang, L., Yuan, X., Wu, T., & Ye, J.** (2024). Optimizing silicon doping levels for enhanced osteogenic and angiogenic properties of 3D-printed biphasic calcium phosphate scaffolds: An in vitro screening and in vivo validation study. *Materials Today Bio*, 28, 101203.
- [145] **Oliveira, R. L., Ferraz, M. C., Cardoso, L. M., Li, Z., Albers, A. P. F., Bottino, M. C., & Trichês, E. S.** (2024). 3D printing of strontium-enriched biphasic calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 160, 106717.
- [146] **Capati, M. L. F., Nakazono, A., Igawa, K., Ookubo, K., Yamamoto, Y., Yanagiguchi, K., ... & Hayashi, Y.** (2016). Boron accelerates cultured osteoblastic cell activity through calcium flux. *Biological Trace Element Research*, 174, 300-308.
- [147] **Atia, G. A. N., Mohamed, S. Z., Halim, H. A., Ghobashy, M. M., Foda, T., Shalaby, H. K., ... & Khan, F. S.** (2024). Advances in Bioceramic silicates for therapeutic, and regenerative Dentofacial reconstruction. *Ceramics International*.
- [148] **Gorustovich, A. A., López, J. M. P., Guglielmotti, M. B., & Cabrini, R. L.** (2006). Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow. *Biomedical Materials*, 1(3), 100.
- [149] **Ternane, R., Cohen-Adad, M. T., Panczer, G., Goutaudier, C., Kbir-Arighuib, N., Trabelsi-Ayedi, M., ... & Massiot, D.** (2002). Introduction of boron in hydroxyapatite: synthesis and structural characterization. *Journal of Alloys and Compounds*, 333(1-2), 62-71.
- [150] **Barheine, S., Hayakawa, S., Osaka, A., & Jaeger, C.** (2009). Surface, interface, and bulk structure of borate containing apatitic biomaterials. *Chemistry of Materials*, 21(14), 3102-3109.
- [151] **Kolmas, J., Velard, F., Jaguszewska, A., Lemaire, F., Kerdjoudj, H., Gangloff, S. C., & Kafilak, A.** (2017). Substitution of strontium and boron into hydroxyapatite crystals: Effect on physicochemical properties and biocompatibility with human Wharton-Jelly stem cells. *Materials Science and Engineering: C*, 79, 638-646.
- [152] **Tunçay, E. Ö., Demirtaş, T. T., & Gümüşderelioğlu, M.** (2017). Microwave-induced production of boron-doped HAp (B-HAp) and B-HAp coated composite scaffolds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 72-81.
- [153] **Atila, D., Karataş, A., Evcin, A., Keskin, D., & Tezcaner, A.** (2019). Bacterial cellulose-reinforced boron-doped hydroxyapatite/gelatin scaffolds for bone tissue engineering. *Cellulose*, 26, 9765-9785.

- [154] **Pazarçeviren, A. E., Tezcaner, A., Keskin, D., Kolukısa, S. T., Sürdem, S., & Evis, Z.** (2021). Boron-doped biphasic hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate for bone tissue engineering. *Biological Trace Element Research*, 199, 968-980.
- [155] **Jodati, H., Evis, Z., Tezcaner, A., Alshemary, A. Z., & Motameni, A.** (2023). 3D porous bioceramic based boron-doped hydroxyapatite/baghdadite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 140, 105722.
- [156] **Baker, R. W.** (2023). *Membrane technology and applications*. John Wiley & Sons.
- [157] **Strathmann, H.** (2011). *Introduction to membrane science and technology*. John Wiley & Sons.
- [158] **Li, N. N., Fane, A. G., Ho, W. W., & Matsuura, T.** (2011). *Advanced Membrane Technology and Applications*. John Wiley & Sons.
- [159] **Demirci, F.** (2018). Synthesis of antibacterial polymers reducing biofilm formation and their application on hollow fiber membranes. (Doktora tezi). Bursa Teknik Üniversitesi, Bursa.
- [160] **Mousavi, S. M., Zarei, M., Hashemi, S. A., Ramakrishna, S., Chiang, W. H., Lai, C. W., ... & Shokripour, M.** (2020). Asymmetric membranes: A potential scaffold for wound healing applications. *Symmetry*, 12(7), 1100.
- [161] **Dong, Y., Zheng, Y., Zhang, K., Yao, Y., Wang, L., Li, X., ... & Ding, B.** (2020). Electrospun nanofibrous materials for wound healing. *Advanced Fiber Materials*, 2, 212-227.
- [162] **Bhushan, S., Singh, S., Maiti, T. K., Sharma, C., Dutt, D., Sharma, S., ... & Tag Eldin, E. M.** (2022). Scaffold fabrication techniques of biomaterials for bone tissue engineering: a critical review. *Bioengineering*, 9(12), 728.
- [163] **He, P., Zhao, J., Zhang, J., Li, B., Gou, Z., Gou, M., & Li, X.** (2018). Bioprinting of skin constructs for wound healing. *Burns & Trauma*, 6.
- [164] **Machado, N. D., Mosquera, J. E., Martini, R. E., Goñi, M. L., & Gañán, N. A.** (2022). Supercritical CO₂-assisted impregnation/deposition of polymeric materials with pharmaceutical, nutraceutical, and biomedical applications: A review (2015–2021). *The Journal of Supercritical Fluids*, 191, 105763.
- [165] **Porter, M. C.** (1989). *Handbook of industrial membrane technology*. Noyes Publications.
- [166] **Sadrzadeh, M., & Bhattacharjee, S.** (2013). Rational design of phase inversion membranes by tailoring thermodynamics and kinetics of casting solution using polymer additives. *Journal of Membrane Science*, 441, 31-44.
- [167] **Bottino, A., Camera-Roda, G., Capannelli, G., & Munari, S.** (1991). The formation of microporous polyvinylidene difluoride membranes by phase separation. *Journal of Membrane Science*, 57(1), 1-20.

- [168] **Chan, K. Y., Li, C. L., Wang, D. M., & Lai, J. Y.** (2023). Formation of porous structures and crystalline phases in poly (vinylidene fluoride) membranes prepared with nonsolvent-Induced phase separation—roles of solvent polarity. *Polymers*, 15(5), 1314.
- [169] **Shuai, C., Liu, G., Yang, Y., Yang, W., He, C., Wang, G., ... & Peng, S.** (2020). Functionalized BaTiO₃ enhances piezoelectric effect towards cell response of bone scaffold. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185, 110587.
- [170] **Ho-Shui-Ling, A., Bolander, J., Rustom, L. E., Johnson, A. W., Luyten, F. P., & Picart, C.** (2018). Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*, 180, 143-162.
- [171] **Rajabi, A. H., Jaffe, M., & Arinzeh, T. L.** (2015). Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review. *Acta Biomaterialia*, 24, 12-23.
- [172] **Wu, S., Chen, M. S., Maurel, P., Lee, Y. S., Bunge, M. B., & Arinzeh, T. L.** (2018). Aligned fibrous PVDF-TrFE scaffolds with Schwann cells support neurite extension and myelination in vitro. *Journal of Neural Engineering*, 15(5), 056010.
- [173] **Genchi, G. G., Sinibaldi, E., Ceseracciu, L., Labardi, M., Marino, A., Marras, S., ... & Ciofani, G.** (2018). Ultrasound-activated piezoelectric P (VDF-TrFE)/boron nitride nanotube composite films promote differentiation of human SaOS-2 osteoblast-like cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(7), 2421-2432.
- [174] **Correia, D. M., Ribeiro, C., Sencadas, V., Vikingsson, L., Gasch, M. O., Ribelles, J. G., ... & Lanceros-Méndez, S.** (2016). Strategies for the development of three dimensional scaffolds from piezoelectric poly (vinylidene fluoride). *Materials & Design*, 92, 674-681.
- [175] **Dos Santos, G. G., Malherbi, M. S., de Souza, N. S., César, G. B., Tominaga, T. T., Miyahara, R. Y., ... & Bonadio, T. G. M.** (2022). 4th Generation Biomaterials Based on PVDF-Hydroxyapatite Composites Produced by Electrospinning: Processing and Characterization. *Polymers*, 14(19), 4190.
- [176] **Cardoso, V. F., Botelho, G., & Lanceros-Méndez, S.** (2015). Nonsolvent induced phase separation preparation of poly (vinylidene fluoride-co-chlorotrifluoroethylene) membranes with tailored morphology, piezoelectric phase content and mechanical properties. *Materials & Design*, 88, 390-397.
- [177] **Morali, A., Mandal, A., Skorobogatiy, M., & Bodkhe, S.** (2023). Unleashing the piezoelectric potential of PVDF: a study on phase transformation from gamma (γ) to beta (β) phase through thermal contact poling. *RSC Advances*, 13(44), 31234-31242.
- [178] **Mavis, B., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G., & Çolak, Ü.** (2009). Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. *Acta Biomaterialia*, 5(8), 3098-3111.

- [179] **Bružauskaitė, I., Bironaitė, D., Bagdonas, E., & Bernotienė, E.** (2016). Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects. *Cytotechnology*, 68(3), 355-369.
- [180] **Rafeie, O., Razavi Aghjeh, M. K., Tavakoli, A., Salami-Kalajahi, M., Jameie-Oskooie, A., & Ghayoumi, M.** (2019). Study on crystalline structure of poly (vinylidene fluoride)/polyethylene/graphene blend-nanocomposites. *Polymer Composites*, 40(11), 4402-4415.
- [181] **Fakhri, V., Monem, M., Mir Mohamad Sadeghi, G., Khonakdar, H. A., Goodarzi, V., & Karimpour-Motlagh, N.** (2021). Impact of poly (ϵ -caprolactone) on the thermal, dynamic-mechanical and crystallization behavior of polyvinylidene fluoride/poly (ϵ -caprolactone) blends in the presence of KIT-6 mesoporous particles. *Polymers for Advanced Technologies*, 32(11), 4424-4439.
- [182] **Silva, L. M., Bonadio, T. G. M., Rosso, J. M., Dias, G. S., Cótica, L. F., Weinand, W. R., ... & Freitas, V. F.** (2018). On the synthesis and characterization of (bio) ferroelectrically active PVDF-BCP composites. *Ferroelectrics*, 533(1), 63-71.
- [183] **Fakhri, V., Jafari, A., Zeraatkar, A., Rahimi, M., Hadian, H., Nouranian, S., ... & Khonakdar, H. A.** (2023). Introducing photo-crosslinked bio-nanocomposites based on polyvinylidene fluoride/poly (glycerol azelaic acid)-g-glycidyl methacrylate for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 11(2), 452-470.
- [184] **Shuai, C., Zeng, Z., Yang, Y., Qi, F., Peng, S., Yang, W., ... & Qian, G.** (2020). Graphene oxide assists polyvinylidene fluoride scaffold to reconstruct electrical microenvironment of bone tissue. *Materials & Design*, 190, 108564.
- [185] **Guo, H. F., Li, Z. S., Dong, S. W., Chen, W. J., Deng, L., Wang, Y. F., & Ying, D. J.** (2012). Piezoelectric PU/PVDF electrospun scaffolds for wound healing applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 96, 29-36.
- [186] **Demirci, F., & Özsel, B. K.** (2023). Electrospun PVDF Membranes Incorporated with Functionalized Carbon-based Material for Removal of Cationic Dyes. *Sakarya University Journal of Science*, 27(2), 386-397.
- [187] **Kokubo, T., & Takadama, H.** (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915.
- [188] **Zare-Harofteh, A., Saber-Samandari, S., & Saber-Samandari, S.** (2016). The effective role of akermanite on the apatite-forming ability of gelatin scaffold as a bone graft substitute. *Ceramics International*, 42(15), 17781-17791.
- [189] **Nunes-Pereira, J., Ribeiro, S., Ribeiro, C., Gombek, C. J., Gama, F. M., Gomes, A. C., ... & Lanceros-Méndez, S.** (2015). Poly (vinylidene fluoride) and copolymers as porous membranes for tissue engineering applications. *Polymer Testing*, 44, 234-241.

- [190] Mostafavi, A., Abdullah, T., Russell, C. S., Mostafavi, E., Williams, T. J., Salah, N., ... & Tamayol, A. (2021). In situ printing of scaffolds for reconstruction of bone defects. *Acta Biomaterialia*, 127, 313-326.
- [191] Valtanen, R. S., Yang, Y. P., Gurtner, G. C., Maloney, W. J., & Lowenberg, D. W. (2021). Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future?. *Injury*, 52, S72-S77.
- [192] Tandon, B., Kamble, P., Olsson, R. T., Blaker, J. J., & Cartmell, S. H. (2019). Fabrication and characterisation of stimuli responsive piezoelectric PVDF and hydroxyapatite-filled PVDF fibrous membranes. *Molecules*, 24(10), 1903.
- [193] Alizadeh-Osgouei, M., Li, Y., & Wen, C. (2019). A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications. *Bioactive Materials*, 4, 22-36.
- [194] Alibakhshi, H., Esfahani, H., & Sharifi, E. (2024). In-situ formation of CoFe₂O₄ within electrospun PVDF scaffolds to achieve a high β content and high magnetic hyperthermia ability. *Ceramics International*, 50(5), 8017-8029.
- [195] Mokhtari, F., Azimi, B., Salehi, M., Hashemikia, S., & Danti, S. (2021). Recent advances of polymer-based piezoelectric composites for biomedical applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 122, 104669.
- [196] Uysal, İ., Yilmaz, B., & Evis, Z. (2020). Boron doped hydroxapatites in biomedical applications. *Journal of Boron*, 5(4), 199-208.
- [197] Ribeiro, C., Sencadas, V., Correia, D. M., & Lanceros-Méndez, S. (2015). Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 46-55.
- [198] Kang, J., Hwang, J. Y., Huh, M., & Yun, S. I. (2020). Porous poly (3-hydroxybutyrate) scaffolds prepared by non-solvent-induced phase separation for tissue engineering. *Macromolecular Research*, 28, 835-843.
- [199] Balzamo, G., Willcock, H., Ali, J., Ratcliffe, E., & Mele, E. (2018). Bioinspired poly (vinylidene fluoride) membranes with directional release of therapeutic essential oils. *Langmuir*, 34(29), 8652-8660.
- [200] Haponska, M., Trojanowska, A., Nogalska, A., Jastrzab, R., Gumi, T., & Tylkowski, B. (2017). PVDF membrane morphology—Influence of polymer molecular weight and preparation temperature. *Polymers*, 9(12), 718.
- [201] Li, Z., Du, T., Ruan, C., & Niu, X. (2021). Bioinspired mineralized collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 6(5), 1491-1511.
- [202] Dehban, A., Saeedavi, F. H., & Kargari, A. (2022). A study on the mechanism of pore formation through VIPS-NIPS technique for membrane fabrication. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 108, 54-71.

- [203] **Fadaei, A., Salimi, A., & Mirzataheri, M.** (2014). Structural elucidation of morphology and performance of the PVDF/PEG membrane. *Journal of Polymer Research*, 21, 1-8.
- [204] **Ismail, N., Venault, A., Mikkola, J. P., Bouyer, D., Drioli, E., & Kiadeh, N. T. H.** (2020). Investigating the potential of membranes formed by the vapor induced phase separation process. *Journal of Membrane Science*, 597, 117601.
- [205] **Yamahara, S., Raudales, J. L. M., Akiyama, Y., Ito, M., Chimedtseren, I., Arai, Y., ... & Honda, M.** (2022). Appropriate pore size for bone formation potential of porous collagen type I-based recombinant peptide. *Regenerative Therapy*, 21, 294-306.
- [206] **Suwanprateeb, J., Luangwattanawilai, T., Theeranattapong, T., Suvannapruk, W., Chumnavej, S., & Hemstapat, W.** (2016). Bilayer oxidized regenerated cellulose/poly ϵ -caprolactone knitted fabric-reinforced composite for use as an artificial dural substitute. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27, 1-12.
- [207] **Murphy, C. M., Haugh, M. G., & O'brien, F. J.** (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3), 461-466.
- [208] **Karageorgiou, V., & Kaplan, D.** (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491.
- [209] **Kitsara, M., Blanquer, A., Murillo, G., Humblot, V., Vieira, S. D. B., Nogués, C., ... & Barrios, L.** (2019). Permanently hydrophilic, piezoelectric PVDF nanofibrous scaffolds promoting unaided electromechanical stimulation on osteoblasts. *Nanoscale*, 11(18), 8906-8917.
- [210] **Arumugam, R., Chinnadurai, R. K., Subramaniam, B. N., Devaraj, B., Subramaniam, V., Sekhar, S. E., & Nallani, S.** (2018). Scalable novel PVDF based nanocomposite foam for direct blood contact and cardiac patch applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 88, 270-280.
- [211] **Shen, W., Wu, S., Ge, X., Ao, F., Mao, Y., Hu, J., & Yan, P.** (2024). Preparation of gastrodin modified P (VDF-TrFE)-Eudragit L100-AuNPs nanofiber membranes with piezoelectric property. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 151, 106355.
- [212] **Cai, X., Lei, T., Sun, D., & Lin, L.** (2017). A critical analysis of the α , β and γ phases in poly (vinylidene fluoride) using FTIR. *RSC Advances*, 7(25), 15382-15389.
- [213] **Cetiner, S., Karakas, H., Ciobanu, R., Olariu, M., Kaya, N. U., Unsal, C., ... & Sarac, A. S.** (2010). Polymerization of pyrrole derivatives on polyacrylonitrile matrix, FTIR–ATR and dielectric spectroscopic characterization of composite thin films. *Synthetic Metals*, 160(11-12), 1189-1196.

- [214] **Zhang, H., Lu, X., Liu, Z., Ma, Z., Wu, S., Li, Z., ... & Wu, C.** (2018). The unidirectional regulatory role of coagulation bath temperature on cross-section radius of the PVDF hollow-fiber membrane. *Journal of Membrane Science*, 550, 9-17.
- [215] **Hamzah, M. S. A., Ng, C., Kasmin, A., Ariffin, L. M., Razak, S. I. A., & Nayan, N. H. M.** (2020). Physical Characterisation of Electrospun PVDF/PVA Nanofibre Membrane as a Potential Artificial Soft Tissue Scaffold Application. *International Journal of Nanoelectronics & Materials*, 13(4).
- [216] **Gaihre, B., & Jayasuriya, A. C.** (2018). Comparative investigation of porous nano-hydroxyapatite/chitosan, nano-zirconia/chitosan and novel nano-calcium zirconate/chitosan composite scaffolds for their potential applications in bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 91, 330-339.
- [217] **Steen, M. L., Jordan, A. C., & Fisher, E. R.** (2002). Hydrophilic modification of polymeric membranes by low temperature H₂O plasma treatment. *Journal of Membrane Science*, 204(1-2), 341-357.
- [218] **Koide, H., Yamaguchi, K., Sato, K., Aoshima, M., Kanata, S., Yonezawa, S., & Asai, T.** (2023). Engineering Temperature-Responsive Polymer Nanoparticles that Load and Release Paclitaxel, a Low-Molecular-Weight Anticancer Drug. *ACS Omega*, 9(1), 1011-1019.
- [219] **Xue, W., & Hamley, I. W.** (2002). Thermoreversible swelling behaviour of hydrogels based on N-isopropylacrylamide with a hydrophobic comonomer. *Polymer*, 43(10), 3069-3077.
- [220] **Loh, Q. L., & Choong, C.** (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size.
- [221] **Ferjaoui, Z., López-Muñoz, R., Akbari, S., Issa, H., Semlali, A., Chandad, F., ... & Fanganiello, R.** (2024). Enhancing Osteogenic Potential in Bone Tissue Engineering: Optimizing Pore Size in Alginate–Gelatin Composite Hydrogels. *Advanced Engineering Materials*, 26(13), 2400247.
- [222] **Vallet-Regi, M.** (2014). *Bio-ceramics with clinical applications*. John Wiley & Sons.
- [223] **Zhou, L., Fan, L., Zhang, F. M., Jiang, Y., Cai, M., Dai, C., ... & Tan, G. X.** (2021). Hybrid gelatin/oxidized chondroitin sulfate hydrogels incorporating bioactive glass nanoparticles with enhanced mechanical properties, mineralization, and osteogenic differentiation. *Bioactive Materials*, 6(3), 890-904.
- [224] **Polley, C., Distler, T., Scheufler, C., Detsch, R., Lund, H., Springer, A., ... & Seitz, H.** (2023). 3D printing of piezoelectric and bioactive barium titanate-bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Today Bio*, 21, 100719.
- [225] **Bormashenko, Y., Pogreb, R., Stanevsky, O., & Bormashenko, E.** (2004). Vibrational spectrum of PVDF and its interpretation. *Polymer Testing*, 23(7), 791-796.

- [226] **Bonadio, T. G., Freitas, V. F., Tominaga, T. T., Miyahara, R. Y., Rosso, J. M., Cótica, L. F., ... & Bhalla, A. S.** (2017). Polyvinylidene fluoride/hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate multifunctional biocomposite: Potentialities for bone tissue engineering. *Current Applied Physics*, 17(5), 767-773.
- [227] **Ahamed, H., & Kumar, V. S.** (2011). A comparative study on the milling speed for the synthesis of nano-structured Al 6063 alloy powder by mechanical alloying. *Journal of Minerals and Materials Characterization & Engineering*, 10(06), 507-515.
- [228] **Li, H., Li, J., Ma, Y., Yan, Q., & Ouyang, B.** (2018). The role of thermo-oxidative aging at different temperatures on the crystal structure of crosslinked polyethylene. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 29, 3696-3703.
- [229] **Sanders, B., Cant, E., Amel, H., & Jenkins, M.** (2022). The effect of physical aging and degradation on the re-use of polyamide 12 in powder bed fusion. *Polymers*, 14(13), 2682.
- [230] **Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B.** (2017). Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1246-1262.
- [231] **Motamedi, A. S., Mirzadeh, H., Hajiesmaeilbaigi, F., Bagheri-Khoulenjani, S., & Shokrgozar, M.** (2017). Effect of electrospinning parameters on morphological properties of PVDF nanofibrous scaffolds. *Progress in Biomaterials*, 6, 113-123.
- [232] **Anderson, J. C., & Eriksson, C.** (1970). Piezoelectric properties of dry and wet bone. *Nature*, 227(5257), 491-492.
- [233] **Mirjalili, F., Mahmoodi, M., & Khazali, S.** (2024). Characterization and in vitro bioactivity evaluation of polyvinyl alcohol incorporated electro spun chitosan/fluor apatite nanofibrous scaffold for bone tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 150, 106322.
- [234] **Khare, D., Basu, B., & Dubey, A. K.** (2020). Electrical stimulation and piezoelectric biomaterials for bone tissue engineering applications. *Biomaterials*, 258, 120280.
- [235] **Abzan, N., Kharaziha, M., & Labbaf, S.** (2019). Development of three-dimensional piezoelectric polyvinylidene fluoride-graphene oxide scaffold by non-solvent induced phase separation method for nerve tissue engineering. *Materials & Design*, 167, 107636.
- [236] **Bagheri, A., & Khodaei, M.** (2024). Baghdadite reinforced polycaprolactone scaffold for bone tissue engineering. *Iranian Polymer Journal*, 33(5), 619-628.
- [237] **Ahmadi, N., Kharaziha, M., & Labbaf, S.** (2019). Core-shell fibrous membranes of PVDF-Ba_{0.9}Ca_{0.1}TiO₃/PVA with osteogenic and piezoelectric properties for bone regeneration. *Biomedical Materials*, 15(1), 015007.

- [238] **Wu, C., & Chang, J.** (2013). A review of bioactive silicate ceramics. *Biomedical Materials*, 8(3), 032001.
- [239] **Sadeghzade, S., Shamoradi, F., Emadi, R., & Tavangarian, F.** (2017). Fabrication and characterization of baghdadite nanostructured scaffolds by space holder method. *Journal of the mechanical behavior of Biomedical Materials*, 68, 1-7.
- [240] **Mehrafzoon, S., Hassanzadeh-Tabrizi, S. A., & Bigham, A.** (2018). Synthesis of nanoporous Baghdadite by a modified sol-gel method and its structural and controlled release properties. *Ceramics International*, 44(12), 13951-13958.
- [241] **Jodati, H., Tezcaner, A., Evis, Z., Alshemary, A. Z., & Çelik, E.** (2023). Synthesis of baghdadite using modified sol–gel route and investigation of its properties for bone treatment applications. *Journal of the Korean Ceramic Society*, 60(2), 381-398.
- [242] **Samree, K., Srithai, P. U., Kotchaplai, P., Thuptimrang, P., Painmanakul, P., Hunsom, M., & Sairiam, S.** (2020). Enhancing the antibacterial properties of PVDF membrane by hydrophilic surface modification using titanium dioxide and silver nanoparticles. *Membranes*, 10(10), 289.
- [243] **Alshammari, M. H., Alshammari, A. O., Elabbasy, M. T., Zreiq, R., Albati, F. M., El-Morsy, M. A., & Menazea, A. A.** (2024). Surface morphology and cell viability of samarium (III) oxide/chromium (III) oxide/graphene oxide/polycaprolactone targeting wound dressing. *Journal of Rare Earths*, 42(3), 555-561.
- [244] **Sun, L. L., Li, B., Zhang, Z. G., & Zhong, W. H.** (2010). Achieving very high fraction of β -crystal PVDF and PVDF/CNF composites and their effect on AC conductivity and microstructure through a stretching process. *European Polymer Journal*, 46(11), 2112-2119.
- [245] **Mokhtari, F., Latifi, M., & Shamshirsaz, M.** (2016). Electrospinning/electrospray of polyvinylidene fluoride (PVDF): piezoelectric nanofibers. *The Journal of The Textile Institute*, 107(8), 1037-1055.
- [246] **Sadeghzade, S., Emadi, R., Tavangarian, F., & Naderi, M.** (2017). Fabrication and evaluation of silica-based ceramic scaffolds for hard tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 431-438.
- [247] **Mutlu, B., Demirci, F., & Duman, Ş.** (2024). Investigating the impact of coagulation bath temperature on the properties of biphasic calcium phosphate/poly (vinylidene fluoride)-based membrane scaffold via immersion precipitation. *Journal of Applied Polymer Science*, e56375.
- [248] **Amirilargani, M., Saljoughi, E., Mohammadi, T., & Moghbeli, M. R.** (2010). Effects of coagulation bath temperature and polyvinylpyrrolidone content on flat sheet asymmetric polyethersulfone membranes. *Polymer Engineering & Science*, 50(5), 885-893.

- [250] **Sadeghzade, S., Liu, J., Wang, H., Li, X., Cao, J., Cao, H., ... & Yuan, H.** (2022). Recent advances on bioactive baghdadite ceramic for bone tissue engineering applications: 20 years of research and innovation (a review). *Materials Today Bio*, 17, 100473.
- [251] **Forogh, M. R., Emadi, R., Ahmadian, M., & Saboori, A.** (2024). Fabrication and Characterization of Polycaprolactone–Baghdadite Nanofibers by Electrospinning Method for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 17(17), 4187.
- [252] **Emadi, H., Baghani, M., Masoudi Rad, M., Hoomehr, B., Baniassadi, M., & Lotfian, S.** (2024). 3D-Printed polycaprolactone-based containing calcium zirconium silicate: bioactive scaffold for accelerating bone regeneration. *Polymers*, 16(10), 1389.
- [253] **Tavakoli, M., Najafinezhad, A., Mirhaj, M., Karbasi, S., Varshosaz, J., Al-Musawi, M. H., ... & Nasiri-Harchegani, S.** (2024). Graphene oxide-encapsulated baghdadite nanocomposite improved physical, mechanical, and biological properties of a vancomycin-loaded PMMA bone cement. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 35(6), 823-850.
- [254] **Salehi, S., Tavakoli, M., Mirhaj, M., Varshosaz, J., Labbaf, S., Karbasi, S., ... & Emami, E.** (2023). A 3D printed polylactic acid-Baghdadite nanocomposite scaffold coated with microporous chitosan-VEGF for bone regeneration applications. *Carbohydrate Polymers*, 312, 120787.
- [255] **Wei, J., Igarashi, T., Okumori, N., Igarashi, T., Maetani, T., Liu, B., & Yoshinari, M.** (2009). Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomedical Materials*, 4(4), 045002.
- [256] **Boyan, B. D., Lotz, E. M., & Schwartz, Z.** (2017). Roughness and hydrophilicity as osteogenic biomimetic surface properties. *Tissue Engineering Part A*, 23(23-24), 1479-1489.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Büşra MUTLU

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2017, Karabük Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği
- **Yüksek Lisans** : 2019, Bursa Teknik Üniversitesi, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

Mesleki Deneyim:

- 2022 – Halen, Öğretim Görevlisi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Bursa Teknik Üniversitesi

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Makaleler:

- **Mutlu, B., Demirci, F., Duman, Ş.** (2024). Influence of Boron Incorporated Biphasic Calcium Phosphate on Mechanical, Thermal and Biological Properties of Poly(vinylidene fluoride) Membrane Scaffold. *Journal of American Ceramic Society*, 107(11), 7274-7288.
- **Mutlu, B., Demirci, F., Duman, Ş.** (2025). Investigating the Impact of Coagulation Bath Temperature on the Properties of Biphasic Calcium Phosphate/Poly(vinylidene Fluoride)-Based Membrane Scaffold via Immersion Precipitation, *Journal of Applied Polymer Science*, 142(3), e56375.

Kongre/Sempozyum Sunumları:

- **Mutlu, B., Demirci, F., Duman, Ş.** (2024). Novel Poly(vinylidene Fluoride)-Baghdadite-Based Composite Membranes as Bone Scaffolds, *MSNG'24. 11th International Conference on Material Science and Nanotechnology for Next Generation*, Çanakkale, Türkiye.
- **Mutlu, B., Demirci, F., Duman, Ş.** (2024). Mechanical and Thermal Properties of Poly(vinylidene fluoride) Baghdadite-based Membrane Scaffolds for Enhanced Separation Performance by Adjusting the Coagulation Bath Temperature, *Eurasiansciencetech'24. International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology*, Ankara, Türkiye.

DİĞER ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Makaleler:

- **Acar, N., Mutlu, B., Akben, H. K., Duman, Ş.,** (2025). Assessing the effects of boron-doped biphasic calcium phosphate on the characteristics of chitosan-based composite foams, *Journal of Porous Materials*, 1-12.
- **Ercelik, M., Tekin, Ç., Gurbuz, M., Tuncbilekli, Y., Yılmaz-Dogan, Y., Mutlu, B., Eser, P., Tezcan, G., Parın, F. N., Yıldırım, K., Sarihan, M., Akpınar, G., Kasap, M., Bekar, A., Kocaeli, H., Taskapilioglu, M.O., Ak-Aksoy, S., Ozpar, R., Hakyemez, B., Tunca, B.** (2024). A new nano approach to prevent tumor growth in the local treatment of glioblastoma: temozolomide and rutin-loaded hybrid layered composite nanofiber, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(6), 100971.
- **Acar, N., Terzioğlu, M.K., Yılmaz, A., Aydoğdu, R., Mutlu, B., Duman, Ş.** (2024). Design and Structural Analysis of 3D-Printed Porous Polylactic Acid/Hydroxyapatite Scaffolds, *International Journal of 3D Printing Technologies and Digital Industry*, 8(1), 71-79.
- **Erçelik, M., Tekin, C., Parın, F. N., Mutlu, B., Yılmaz-Dogan, H., Tezcan, G., Ak-Aksoy, S., Gürbüz, M., Yıldırım, K., Bekar, A., Kocaeli, H., Taşkapılıoğlu, M.O., Eser, P., Tunca, B.** (2023). Co-loading of Temozolomide with Oleuropein or Rutin into Polylactic Acid Core-Shell Nanofiber Webs Inhibit Glioblastoma Cell by Controlled Release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126722.
- **Bulut, B., Duman, Ş.** (2022). Evaluation of Mechanical Behavior, Bioactivity and Cytotoxicity of Chitosan/Akermanite-TiO₂ 3D-printed Scaffolds for Bone Tissue Applications, *Ceramics International*, 48(15), 21378-21388.
- **Mutlu, B., Çaylak, S., Duman, Ş.** (2022). Incorporation of Cerium Oxide into Hydroxyapatite/Chitosan Scaffolds for Bone Repair, *Processing and Applications of Ceramics*, 16(3), 207-217.
- **Duman, Ş., Bulut, B.** (2022). Antibacterial, Optical, and Microstructural Properties Investigations of Ag-doped TiO₂ and TiO₂/PVA Nanocomposite Powders, *Gümüşhane University Journal of Sciences and Technology*, 12(2), 687-698.
- **Duman, Ş., Bulut, B.** (2021). Effect of Akermanite Powders on Mechanical Properties and Bioactivity of Chitosan-based Scaffolds Produced by 3D-Bioprinting, *Ceramics International*, 47(10), 13912-13921.
- **Bulut, B., Duman, Ş.** (2021). Effects of Calcination Temperature on Hydrothermally Synthesized Titanium Dioxide Submicron Powders, *Konya Journal of Engineering Sciences*, 9(3), 676-685.
- **Duman, Ş., Bulut, B., Özkal, B.** (2020). Antibacterial and Optical Properties of Mn Doped ZnO Nanopowders Synthesized via Spray Drying and Subsequent Thermal Decomposition, *Cukurova University Journal of Faculty of Engineering and Architecture*, 35(4), 1073-1081.

Kongre/Sempozyum Sunumları:

- **Erçelik, M., Tekin, Ç., Mutlu, B., Parın, F. N., Yıldırım, K., Tunca, B.** (2024). Hepatosellüler Karsinomda Lokal Tedavi için Nanoteknoloji Tabanlı Yaklaşım: Hidroksitirozol ve Tirozol Kapsüllenmiş PVA Nanolifleri ile 3 Boyutlu Tümör Boyutunun Küçültülmesi, *Türkiye Organ Nakli Kuruluşları Koordinasyon*

Derneği XV. Kongresi (Transplantasyon'24), Gaziantep, Türkiye.

- **Özer, H., Mutlu, B., Demirci, F., Duman, Ş.** (2024). PLA-based 3D Porous Scaffolds with Bioceramics for Load-Bearing Bone Substitutes, *8th International Congress on 3D Printing (Additive Manufacturing) Technologies and Digital Industry*, Antalya, Türkiye.
- **Erçelik, M., Tekin, Ç., Mutlu, B., Parın, F.N, Yıldırım, K., Tunca, B.** (2024). Bioactive Compound-loaded PVA Nanofibers Inhibit the Proliferation of Glioblastoma Cells, *14th International Fiber and Polymer Research Symposium (ULPAS'24)*, Bursa, Türkiye.
- **Acar, N., Mutlu, B., Akben, H.K, Duman, Ş.** (2023). Seryum/Vollastonit Katkılı Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi, Mekanik ve Biyoaktivite Özelliklerinin Değerlendirilmesi, *Yönetim Araştırmaları/Mühendislik Uygulamaları Sempozyumu (YONARMU'23)*, İstanbul, Türkiye.
- **Mutlu, B., Acar, N., Küçük, M., Duman, Ş.** (2022). The Effect of Cerium on the Structural and Biological Properties of Composite Scaffolds, *5th International Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem'22)*, Ankara, Türkiye.
- **Bulut, B., Çeper, B., Duman, Ş., Akben, H. K.** (2021). Bifazik Kalsiyum Fosfat/Kitosan Esaslı Kompozit Doku İskelelerinin Yapısal ve Biyolojik Özellikleri Üzerine Metal İyonu Etkisi, *25. Ulusal Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu (BIOMED'21)*, Ankara, Türkiye.
- **Bulut, B., Duman, Ş.** (2021). Effect of Metal Oxide Incorporation on the Structure and *In Vitro* Bioactivity of Natural Polymer/Inorganic Material-Based Hybrid Scaffolds, *6th International Conference on Material Science and Technology (IMSTEC'21)*, Kapadokya, Türkiye.
- **Acar, N., Bulut, B., Duman, Ş.** (2021). Fabrication and Characterization of Boron-doped Biphasic Calcium Phosphate/Chitosan Scaffold. *International Conference on Engineering, Natural and Applied Science (ICENAS'21)*, Osmaniye, Türkiye.
- **Çeper, B., Bulut, B., Duman, Ş., Akben, H. K.** (2021). Metal-Loaded Biphasic Calcium Phosphate/Chitosan Bone Scaffolds: Structural, Mechanical and *In Vitro* Evaluation. *6th International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC'21)*, Antalya, Türkiye.
- **Bulut, B., Duman, Ş.** (2021). Doku Mühendisliği Uygulamaları için Gözenekli Kompozit Doku İskelelerinin Üretimi ve Mikroyapısal Karakterizasyonu, *25. Ulusal Elektronik Mikroskopik Kongresi (EMK'21)*, İzmir, Türkiye.
- **Acar, N., Bulut, B., Ünver, O., Duman, Ş.** (2021). Preparation and Properties of Biphasic Calcium Phosphate Reinforced Chitosan Scaffolds. *4th International Conference on Material Science, Mechanical and Automotive Engineerings and Technology (IMSMATEC'21)*, Nevşehir, Türkiye.
- **Çeper, B., Bulut, B., Duman, Ş., Akben, H. K.** (2021). Effects of Sm Doping on the Synthesis and Antibacterial Properties of BCP Bioceramics. *5th International Congress on Engineering and Technology Management (ICET'21)*, İstanbul, Türkiye.
- **Bulut, B., Duman, Ş.** (2021). Biyomedikal Uygulamalar İçin Metal Oksit Katkılı Akermanit Üretimi ve Karakterizasyonu, *Yönetim Araştırmaları/Mühendislik Uygulamaları Sempozyumu (YONARMU'21)*, İstanbul, Türkiye.
- **Bulut, B., Duman, Ş.** (2021). 3D-Bioprinted Chitosan Scaffolds Containing Hydroxyapatite Reinforced Cerium Oxide for Bone Regeneration. *International X.*

Biomechanics Congress (BIOMECH'21), 26-27 March 2021 – İzmir – Turkey.

- **Bulut, B., Duman, Ş., Eroğlu, M., Gültekin-Özgüven, M.** (2020). Effect of Dopants on Akermanite-Hydroxyapatite Bioceramic Powders. *International Conference on Engineering Technologies (ICENTE'20)*, Konya, Türkiye.
- **Parın, F.N, Bulut, B., Borand, G., Duman, Ş., Uzunsoy, D., Yıldırım, K.** (2019). Characterization and Production of Mn Doped TiO₂ Nanofibers via Electrospinning Method. *International Materials Technologies and Metallurgy Conference (MTM'2019)*, İstanbul, Türkiye.
- **Bulut, B., Duman, Ş.** (2019). Ni Katkılı Karbon Kaplı TiO₂ Nanopartiküllerin Yapısal, Optik ve Fotokatalitik Özellikleri, *X. Uluslararası Katılımlı Seramik Kongresi (SERKON'19)*, Afyon, Türkiye.
- **Bulut, B., Duman, Ş.** (2019). Production and Characterization of PVP-doped Akermanite Powders. *The Porous and Powder Materials Symposium and Exhibitions (PPM'2019)*, Marmaris, Türkiye.
- **Tezel, Meydaneri, F., Varlık, E., Engin, B., Bulut, B., Özbay, O.** (2017). Influence of Heat Treatment on Thermal, Mechanical and Microstructural Characterization of Al based Mg-Al-Sb Eutectic Alloy, *International Conference on Engineering Technology and Innovation (ICETI'2017)*, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

Patentler:

- **Tunca, B., Ercelik, M., Yıldırım, K., Parın, F. N., Mutlu, B., Ocak, P., Ak-Aksoy, S., Tekin, Ç., Bekar, A, Taskapilioglu, M.O., Kocaeli, H., Tezcan, G.,** (2024). Beyin Tümörlerinde Nüksü Engellemede Cerrahi Rezeksiyon Alanında Lokal Kullanıma Yönelik Kemoterapi İlacı ve/veya Biyoaktifmolekül Yüklü Katmanlı Hibrit Nanolif Yapıda İlaç Taşıma Sistemi, 2023/018556.