

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS
METALURJİ VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ**

**GRAFEN İÇEREN BİYOAKTİF CAM SKAFOLDLARIN
HAZIRLANMASI VE *IN VITRO* KARAKTERİZASYONU**

Mert TÜRK

**Danışman
Doç. Dr. Aylin Müyesser DELİORMANLI**



MANİSA-2018

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS
METALURJİ VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ**

**GRAFEN İÇEREN BİYOAKTİF CAM SKAFOLDLARIN
HAZIRLANMASI VE *IN VITRO* KARAKTERİZASYONU**

Mert TÜRK

**Danışman
Doç. Dr. Aylin Müyesser DELİORMANLI**



MANİSA-2018

TEZ ONAYI

Mert TÜRK tarafından hazırlanan “**Grafen İçeren Biyoaktif Cam Skafoldların Hazırlanması ve *In Vitro* Karakterizasyonu**” adlı tez çalışması 15/02/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman	Doç. Dr. Aylin M. DELİORMANLI Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Yılmaz YÜREKLİ Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Abdullah SEYRANKAYA Dokuz Eylül Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Mert TÜRK



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLO DİZİNİ.....	vii
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Doku Mühendisliği.....	4
2.1.1. Kemik Doku Mühendisliği.....	6
2.1.1.1. Kemik Doku Mühendisliğinde Skafoldların Önemi	7
2.2. Biyomalzemeler.....	10
2.2.1. Metaller ve Alaşımlar	10
2.2.2. Polimerler	11
2.2.2.1. Doğal Polimerler	11
2.2.2.2. Sentetik Polimerler	11
2.2.2.2.1. Polikaprolakton (PCL).....	12
2.2.3. Seramikler ve Camlar	13
2.2.3.1. Biyoinert Seramikler	14
2.2.3.2. Biyoaktif Seramikler	15
2.2.3.3. Biyobozunur Seramikler.....	15
2.3. Biyoaktif Camlar	15
2.3.1. Silika Bazlı Biyoaktif Camlar	15
2.3.2. Bor Bazlı Biyoaktif Camlar	20
2.4. Grafen	22
2.4.1. Grafenin Yapısı ve Özellikleri	22
2.4.2. Grafenin Biyomedikal Uygulamaları	26
2.5. Skafold Hazırlama Yöntemleri.....	29
2.5.1. Sol-jel İşlemi	29
2.5.2. Polimer Köpük Replikasyonu	29
2.5.3. Dondurarak Döküm (Freeze-Casting)	30
2.5.4. Jel-Döküm.....	31
2.5.5. Katı Serbest Şekillendirme (SFF).....	32
2.6. Biyoaktif Cam-Grafen Kompozit Skafoldlar	32
3. MATERYAL VE METOT.....	35
3.1. Kullanılan Malzemeler	35
3.2. Skafoldların Hazırlanması	36
3.2.1. Grafen İçeren 13-93B3 Biyoaktif Cam Skafoldlar (Metot I).....	37
3.2.2. Grafen İçeren Polikaprolakton Kaplı 13-93B3 Biyoaktif Cam Skafoldlar (Metot II).....	40
3.3. Karakterizasyonlar.....	42
3.3.1. Morfolojik Karakterizasyonlar	42
3.3.2. Elektriksel İletkenlik Testleri	43
3.3.3. Basma Dayanımı	44
3.3.4. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizleri	44
3.3.5. X Işını Kırınımı (XRD) Analizleri	45

3.3.6. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analizleri	45
3.3.7. <i>In Vitro</i> Degredasyon ve Mineralizasyon Deneyleri	46
3.3.8. <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Testleri	48
3.3.8.1. XTT Analizi	49
3.3.8.2. ALP (Alkalin Fosfataz Aktivitesi) Analizi	50
3.3.8.3. Floresans Boyama	51
3.3.8.4. Hücre Morfolojisi.....	51
3.3.8.5. İstatistiksel Analiz.....	52
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	53
4.1. Grafen İçeren 13-93B3 Biyoaktif Cam Skafoldlar (Metot I).....	53
4.1.1. Morfolojik Karakterizasyonlar ve Faz Analizleri.....	53
4.1.2. Elektriksel İletkenlik.....	58
4.1.3. Mekanik Özellikler	60
4.1.4. <i>In Vitro</i> Degredasyon ve Mineralizasyon Deneyleri	62
4.1.5. XTT Analizi	69
4.2. Grafen İçeren Polikaprolakton Kaplı 13-93B3 Biyoaktif Cam Skafoldlar (Metot II)	70
4.2.1. Morfolojik Karakterizasyonlar	70
4.2.2. Elektriksel İletkenlik.....	73
4.2.3. Mekanik Özellikler	75
4.2.4. <i>In Vitro</i> Degredasyon ve Mineralizasyon Deneyleri	76
4.2.5. <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Testleri	81
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR.....	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	Alkaline Phosphatase
CNT	Karbon Nanotüp
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ECM	Ekstraselüler Matriks
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
HA	Hidroksiapatit
MEM	Minimum Esansiyel Medyum
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromit
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
PCL	Polikaprolakton
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate buffered saline)
RNA	Ribo Nükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SBF	Yapay Vücut Sıvısı (Simulated Body Fluid)
UV	Morötesi
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-tetrazolium-5-carboxonilide
XRD	X-ışını Kırınım Analizi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Doku mühendisliği uygulamasını gösteren şematik; (1) hastadan alınan kaynak hücre, (2) <i>in vitro</i> ortamda hücrelerin çoğaltılması, (3) skafold üzerine hücrelerin ekilmesi, (4) <i>in vitro</i> oluşturulan kültür ortamıyla dokunun büyümesi, (5) hastaya implantasyon [19].	5
Şekil 2.2. Kemik dokuda yer alan kemik hücrelerinin şematik gösterimi [28].	7
Şekil 2.3. Biyoaktif cam yüzeyinde hidroksiapatit tabakasının oluşumu sırasında gerçekleşen kimyasal reaksiyonları gösteren şematik [58].	17
Şekil 2.4. Grafen ve grafen temelli malzemelerin yapısını gösteren şematik. (a) grafen, (b) fulleren, (c) karbon nanotüp, (d) grafit [74].	23
Şekil 2.5. Fiziksel ayrıştırma; potasyum kullanılarak birbirlerinden ayrılan grafit tabakalarını gösteren şematik [93].	25
Şekil 2.6. Grafenin üretim yöntemlerini gösteren şematik [90].	26
Şekil 2.7. Polimer köpük replikasyonu proses şeması [113].	30
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan (a) grafen nanotozları, (b) 1393-B3 biyoaktif cam tozlarının SEM mikrografları.	35
Şekil 3.2. Polimer köpük replikasyonu işleminde kullanılan poliüretan köpüklerin dijital görüntüleri.	36
Şekil 3.3. Grafen katkılı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların Metot-I'e göre hazırlanışını gösteren şematik.	37
Şekil 3.4. Sinterleme işlemi öncesi kurumaya bırakılan grafen içeren biyoaktif cam skafoldların dijital görüntüleri.	38
Şekil 3.5. Grafen içeren PCL kaplanmış 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların hazırlanışını gösteren şematik.	40
Şekil 3.6. Gözenekli cam skafoldların grafen nanotozları içeren PCL solüsyonuyla kaplanması işlemini gösteren fotoğraf.	41
Şekil 3.7. Projede kapsamında kullanılan; (a) SEM cihazı (Quanta FEG 250), (b) numune kaplamada kullanılan Emitech K550X cihazı.	45
Şekil 4.1. 13-93B3 biyoaktif cam tozunun tane boyut ölçüm sonucunu gösteren grafik.	53
Şekil 4.2. Polimer köpük replikasyonu ile hazırlanmış grafen katkılı numunelerin sinterleme sonrası dijital görüntüleri; (a) Katkısız B3, (b) %1G-B3, (c) %3G-B3, (d) %5G-B3, (e) %10G-B3.	54
Şekil 4.3. Polimer köpük replikasyonu ile hazırlanmış grafen katkılı numunelerin optik mikroskop görüntüleri; (a)(b) Katkısız B3, (c)(d) %1G-B3, (e)(f) %3G-B3, (g)(h) %5G-B3, (i)(j) %10G-B3.	55
Şekil 4.4. Metot I'e göre hazırlanan numunelerin SEM görüntüleri (ölçek 10 µm); (a) %1G-B3, (b) %3G-B3, (c) %5G-B3, (d) %10G-B3.	56
Şekil 4.5. Grafen ve grafen katkılı kompozit biyoaktif cam skafoldların XRD diyagramları; (a) Grafen, (b) %1G-B3, %3G-B3, %5G-B3, (c) %10G-B3.	57
Şekil 4.6. Grafen içeren 13-93B3 kompozit skafoldların porozitelerini gösteren grafik.	58
Şekil 4.7. Metot I'e göre hazırlanan kompozit skafoldların elektriksel iletkenlik değerlerini gösteren grafik.	59

Şekil 4.8. Grafen katkısının skafoldların basma dayanımına etkisini gösteren grafik.	60
Şekil 4.9. (a) Katkısız B3, (b) %10G-B3 örneklerinin gerilme-şekil değiştirme grafikleri.	61
Şekil 4.10. SBF içerisinde 7 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek:50 µm) ve yüksek (X10000, ölçek:10 µm) büyütmeledeki SEM görüntüleri; (a)(b) Katkısız B3, (c)(d) %1G-B3, (e)(f) %3G-B3, (g)(h) %5G-B3, (i)(j) %10G-B3.....	63
Şekil 4.11. SBF içerisinde 15 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek:50 µm) ve yüksek (X10000, ölçek:10 µm) büyütmeledeki SEM görüntüleri; (a)(b) Katkısız B3, (c)(d) %1G-B3, (e)(f) %3G-B3, (g)(h) %5G-B3, (i)(j) %10G-B3.....	64
Şekil 4.12. SBF içerisinde 30 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek:50 µm) ve yüksek (X10000, ölçek:10 µm) büyütmeledeki SEM görüntüleri; (a)(b) Katkısız B3, (c)(d) %1G-B3, (e)(f) %3G-B3, (g)(h) %5G-B3, (i)(j) %10G-B3.....	65
Şekil 4.13. Farklı sürelerde SBF'te bekletilen numunelerin FTIR spektrumları; (a) %1G-B3, (b) %3G-B3, (c) %5G-B3, (d) %10G-B3.....	66
Şekil 4.14. 30 gün süreyle SBF'te bekletilmiş grafen katkılı 1393-B3 biyoaktif cam skafoldların XRD diyagramları.	67
Şekil 4.15. SBF içerisinde bekletilen biyoaktif cam kompozit skafoldların zamana bağlı ağırlık kayıplarını gösteren grafik.	68
Şekil 4.16. Skafoldların içinde bekletildiği SBF'lerin zamana bağlı pH değişimlerini gösteren grafik.	69
Şekil 4.17. MC3T3-E1 osteoblast hücrelerinin grafen içeren biyoaktif cam skafoldlar üzerindeki canlılık oranlarını gösteren grafik (*p<0,05).	70
Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda grafen içeren PCL kaplanmış 1393B3 skafoldların dijital görüntüleri; (a) PCL-B3, (b) %1G-PCL-B3, (c) %3G-PCL-B3, (d) %5G-PCL-B3, (e) %10G-PCL-B3.....	70
Şekil 4.19. PCL ve grafen kaplı numunelerin optik mikroskop görüntüleri; (a)(b) PCL-B3, (c)(d) %1G-PCL-B3, (e)(f) %3G-PCL-B3, (g)(h) %5G-PCL-B3, (i)(j) %10G-PCL-B3.	72
Şekil 4.20. Grafen katkılı PCL ile kaplı 1393-B3 biyoaktif cam skafoldların porozite değerlerini gösteren grafik.	73
Şekil 4.21. Metot II'ye gööre hazırlanan PCL kaplanmış B3 kompozit skafoldların sahip oldukları iletkenlik değerlerinin grafen konsantrasyonu ile değişimini gösteren grafik.	74
Şekil 4.22. Grafen içeren PCL kaplanmış skafoldların basma dayanım değerlerini gösteren grafik.....	75
Şekil 4.23. Grafen içeren PCL kaplanmış skafoldların gerilme-şekil değiştirme grafikleri: (a) %1G-PCL-B3, (a) %3G-PCL-B3, (a) %5G-PCL-B3, (a) %10G-PCL-B3.....	76
Şekil 4.24. SBF içerisinde bekletilen PCL kaplanmış B3 kompozit skafoldların zamana bağlı ağırlık kayıplarını gösteren grafik.	77
Şekil 4.25. SBF pH değerlerinin skafoldların bekleme süresine bağlı değişimini gösteren grafik.	78
Şekil 4.26. SBF içerisinde 7 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek: 50 µm) ve yüksek (X25000, ölçek: 5 µm) büyütmeledeki	

	SEM görüntüleri; (a)(b) %1G-PCL-B3, (c)(d) %3G-PCL-B3, (e)(f) %5G-PCL-B3, (g)(h) %10G-PCL-B3.....	79
Şekil 4.27.	SBF içerisinde 30 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek: 50 µm) ve yüksek (X25000, ölçek: 5 µm) büyütmelerdeki SEM görüntüleri; (a)(b) %1G-PCL-B3, (c)(d) %3G-PCL-B3, (e)(f) %5G-PCL-B3, (g)(h) %10G-PCL-B3.....	80
Şekil 4.28.	Grafen içeren PCL kaplanmış B3 skafoldların üzerine ekilen MC3T3-E1 hücrelerinin zamana bağlı canlılık değişimini gösteren grafik (* p<0,05).....	82
Şekil 4.29.	PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldlar ALP aktivitesinin zamana bağlı değişimini gösteren grafik (** p<0,01).....	83
Şekil 4.30.	Hücre kültürü sonrası (3 gün) floresans boyama yapılan grafen içeren PCL kaplı 13-93B3 örneklerin mikroskop görüntüleri (Büyütme x200).....	84
Şekil 4.31.	Hücre kültürü sonrası (7 gün) floresans boyama yapılan grafen içeren PCL kaplı 13-93B3 örneklerin mikroskop görüntüleri (Büyütme x200).....	85
Şekil 4.32.	Hücre kültürü sonrası (14 gün) floresans boyama yapılan grafen içeren PCL kaplı 13-93B3 örneklerin mikroskop görüntüleri (Büyütme x200).....	85
Şekil 4.33.	Grafen içeren PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldlar üzerine ekilen MC3T3-E1 hücrelerinin faz kontrast mikroskopla alınan görüntüleri; (a)(d)(g) PCL-B3, (b)(e)(h) %5G-PCL-B3, (c)(f)(i) %10G-PCL-B3 (Büyütme X200).....	86
Şekil 4.34.	Hücre kültürünün 3. gününde grafen içeren PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldların üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri; (a)(b) PCL-B3, (c)(d) %1G-PCL-B3, (e)(f) %3G-PCL-B3, (g)(h) %5G-PCL-B3, (i)(j) %10G-PCL-B3.....	88
Şekil 4.35.	Hücre kültürünün 7. gününde grafen içeren PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldların üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri; (a)(b) PCL-B3, (c)(d) %1G-PCL-B3, (e)(f) %3G-PCL-B3, (g)(h) %5G-PCL-B3, (i)(j) %10G-PCL-B3.....	89
Şekil 4.36.	Hücre kültürünün 14. gününde grafen içeren PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldların üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri; (a)(b) PCL-B3, (c)(d) %1G-PCL-B3, (e)(f) %3G-PCL-B3, (g)(h) %5G-PCL-B3, (i)(j) %10G-PCL-B3.....	90

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Farklı biyoaktif cam kompozisyonlarına ait içerik tablosu [58].	18
Tablo 3.1. Polimer köpük replikasyonu yönteminde kullanılan biyoaktif cam süspansiyonunun bileşimi.	37
Tablo 3.2. Biyoaktif cam skafoldların sinterlenmesinde uygulanan fırın rejimini gösteren tablo.	39
Tablo 3.3. Metot I kullanılarak hazırlanan skafoldların içeriğine göre kodlamalarını gösteren tablo.	40
Tablo 3.4. Metot II yöntemiyle hazırlanan skafoldların kodlamalarını gösteren tablo.	41
Tablo 3.5. Kan plazması ve yapay vücut sıvısının iyon konsantrasyonlarını gösteren tablo [138].	46
Tablo 3.6. Çalışmada kullanılan yapay vücut sıvısı (SBF) reçetesi (1 litre için).	47
Tablo 4.1. Proje kapsamında Metot I ve Metot II kullanılarak üretilen kompozit cam skafoldların elektriksel iletkenlik değerlerini gösteren tablo.	74

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren yeri geldiğinde benden daha çok emek sarf eden danışman hocam sayın Doç. Dr. Aylın M. DELİORMANLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bütün deneysel çalışmalarda eşsiz yardımı ve çabası bulunan Arş. Gör. Kürşat KANBUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hücre kültürü deneylerinin, XRD ve FTIR analizlerinin yapılmasını sağlayan başta Arş. Gör. Dr. Harika ATMACA olmak üzere tüm CBÜ DEFAM personeline, SEM analizlerinin gerçekleştirilmesinde önemli yardımları bulunan Mutlu Devran YAMAN ve tüm İYTE Malzeme Araştırma Merkezi personeline teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez hazırlama sürecinde verdikleri destek için aileme çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından, 114M519 kodlu proje kapsamında desteklenmiştir.

Mert TÜRK

Manisa, 2018

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Grafen İçeren Biyoaktif Cam Skafoldların Hazırlanması ve *In Vitro* Karakterizasyonu

Mert TÜRK

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aylin M. DELİORMANLI

Kemik doku mühendisliği, hasar gören kemik dokusunun onarımı ve rejenerasyonu alanında etkin çalışmaların yapıldığı bir alandır. Biyoaktif camlar, kemikle aralarında güçlü bağ kurabilmeleri sayesinde kemik doku rejenerasyonunda kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada kemik doku mühendisliği uygulamaları için polimer köpük replikasyonu tekniği kullanılarak, grafen içeren, elektriksel olarak iletken, bor bazlı 13-93B3 biyoaktif cam kompozit skafoldlar hazırlanmıştır. Grafenin yapıya ilavesi için iki farklı yöntem izlenmiştir. İlk yöntemde (Metot I) grafen nanotozları (ağırlıkça %1, 3, 5, 10) biyoaktif cam süspansiyonu içerisine eklenmiş ve polimer köpük replikasyonu ile grafen-biyoaktif cam kompozit skafoldlar elde edilmiştir. Sonuçlar grafen ilavesinin mekanik özellikleri olumsuz etkilemediğini ve biyoaktif cam skafoldların elektriksel iletkenliğini arttırdığını göstermiştir. X-ışını kırınım analizi sonuçları yapay vücut sıvısında 30 gün bekletilen skafoldların yüzeyinde kristal yapıda hidroksiapatit nanotozları çökmesinin gerçekleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte, Fourier transform infrared spektroskopisi analizleri ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) görüntüleri, hidroksiapatit oluşum hızının, özellikle yapay vücut sıvısında kısa sürelerle bekletilen örneklerde, grafen konsantrasyonunun artmasıyla azaldığını ortaya koymuştur. Diğer yandan, *in vitro* sitotoksikite tayini bulguları, pre-osteoblast MC3T3-E1 hücre canlılığının, katkısız biyoaktif cam skafold ile karşılaştırıldığında yüksek miktarda grafen içeren cam skafoldlarda düşük olduğunu göstermektedir. En iyi performans, orta düzeyde hücresel tepki ve *in vitro* hidroksiapatit oluşturma kabiliyeti ile elektrik iletkenliğinde bir artış sağlayan ağırlıkça %5 grafen içeren skafoldlarda elde edilmiştir. İkinci üretim yönteminde (Metot II) 13-93B3 biyoaktif cam skafoldlar yine polimer köpük replikasyonu ile hazırlanmış ve sinterlenmiştir. Ardından yapı, ağırlıkça %1, 3, 5, 10 grafen nanotozları içeren polikaprolakton (PCL) çözümü ile kaplanmıştır. Sonuçlar, PCL içindeki grafen nanotozlarının konsantrasyonu arttıkça, numunelerin elektrik iletkenliği ve basma dayanımının arttığını göstermiştir. SEM analizleri, yapay vücut sıvısında bekletilmiş katkısız ve grafen içeren PCL kaplı biyoaktif cam skafoldlar arasında grafen konsantrasyonuna bağlı olarak hidroksiapatit oluşumunda belirgin bir fark olmadığını göstermektedir. *In vitro* sitotoksikite deneyleri, grafen içeren PCL kaplı örneklerin pre-osteoblastik MC3T3-E1 hücre canlılığının, 7 gün inkübasyondan sonra kontrol grubu örneklerine

göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, ağırlıkça %3'ten başlamak üzere grafen içeren PCL kaplanmış numuneler için 14 günlük kültür süresi sonrasında hücre canlılığında bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmada, grafen içeren PCL kaplı biyoaktif cam skafoldlarda katkısız PCL kaplı 13-93B3 skafoldlara göre daha yüksek bir ALP aktivitesi tespit edilmiştir. Bu durum grafen nanoparçacıklarının varlığının, osteoblastik farklılaşmanın erken safhasını uyardığını ortaya çıkarmıştır. Çalışmanın sonuçları, her iki yöntemle üretilen elektriksel olarak iletken, grafen içeren, 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktif Cam, Grafen, Polikaprolakton, Skafoldlar, Kemik Doku Mühendisliği.

2018, 113 sayfa



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Preparation and *In vitro* Characterization of Graphene-containing Bioactive Glass Scaffolds

Mert TÜRK

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Metallurgical and Materials Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aylin M. DELİORMANLI

Bone tissue engineering is a field containing studies on the repair and regeneration of the damaged bone tissue. Bioactive glasses have crucial effect in bone regeneration due to their ability to make strong bonding with the bone tissue. In this study, graphene-containing, electrically conductive, borate-based 13-93B3 bioactive glass composite scaffolds were prepared for bone tissue applications. Graphene was incorporated to the bioactive glass structure using two different approaches. In the first method (Method I), graphene nanopowders (1, 3, 5, 10 wt. %) were added to the bioactive glass suspension and bioactive glass composite scaffolds were manufactured using polymer foam replication method. It was observed that the addition of graphene did not adversely affect the mechanical properties and increased the electrical conductivity of the glass scaffolds. In the X-ray diffraction analysis, the peak corresponding to the hydroxyapatite crystal was observed in all samples, indicating that all the samples were bioactive after 30 days of immersion into the simulated body fluid. However, Fourier transform infrared spectroscopy analysis and scanning electron microscope observations have shown that the rate of hydroxyapatite formation decreases with increasing graphene concentration, especially in samples incubated in short periods in simulated body fluid. Based on cytotoxicity assay findings, pre-osteoblastic MC3T3-E1 cell growth was significantly inhibited by scaffolds containing a higher amount of graphene compared to the bare bioactive glass scaffold. The best performance was obtained for samples containing 5% graphene, which provides an increase in electrical conductivity with moderate cellular response and the ability to form hydroxyapatite *in vitro*. In the second approach (Method II), bare 13-93B3 bioactive glass scaffolds were prepared by polymer foam replication method using the same conditions with Method I. After sintering they were coated with the graphene-containing (1, 3, 5, 10 wt. %) polycaprolactone (PCL) solution. Results revealed that electrical conductivity and compression strength of the samples increased with increasing concentration of graphene nanopowders. Based on SEM analysis a noticeable difference was not observed in HA forming ability of the bare and the graphene-coated scaffolds immersed in simulated body fluid. *In vitro* cytotoxicity experiments showed that pre-osteoblastic MC3T3-E1 cell viability of the graphene-containing samples was higher than control group samples after 7 days of incubation. However, a decrease in cell

viability was obtained after 14 days for samples coated with graphene starting from 3 wt. %. Additionally, a higher ALP activity was detected in cells cultured on the graphene-containing borate glass scaffolds than those on the bare PCL coated 13-93B3 scaffolds suggested the presence of graphene nanopowders stimulated an early stage of osteoblastic differentiation. The results of the study showed that electrically conductive 13-93B3 bioactive glass composite scaffolds produced by both approaches have potential to be used in bone tissue engineering applications.

Keywords: Bioactive Glass, Graphene, Polycaprolactone, Scaffolds, Bone Tissue Engineering.

2018, 113 pages



1. GİRİŞ

Kemik, iç organları koruma ve destekleme, kasların tutunmasını sağlayarak hareket kabiliyetine destek olma ve vücudun yükünü taşıma gibi hayati görevleri olan çok işlevli bir yapıdır. Yetişkin bir insanın vücudunda (susamsı kemikler hariç) 206 adet kemik bulunmaktadır. Bu çok işlevli ve hayati öneme sahip kemiğin hayatın herhangi bir döneminde travma, yaralanma, hastalık veya yaşlanma sebebiyle görevini yerine getirememesi insanın hayat standardını önemli ölçüde düşüren bir durumdur. Bu sebeple kemik rejenerasyonu çok önemli bir değer haline gelmiştir. Kemik rejenerasyonu ile işlevini kaybetmiş dokunun en kısa sürede yeniden eski performansına dönmesi amaçlanmaktadır [1].

Grafen sp^2 karbon atomlarının tek katmanlıdır ve karbon nanotüp gibi tüm karbon allotroplarının yapı taşıdır. Sahip olduğu yüksek mekanik, elektriksel ve termal özelliklerinden dolayı bilim dünyasında özel ilgi görmektedir. Elektrik iletkenliği ve yük taşıyıcı mobilitesi, grafeni, piller, yarı iletkenler ve elektrokimyasal sensörler gibi elektronik cihazlar için önemli bir malzeme haline getirmektedir. Bu alanda en iletken polimerleri bile geride bırakmayı başarmaktadır. Grafen, seramikler için de mükemmel takviye malzemesi olarak uygulanabilir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, ilaç taşınımı, kanser terapisi, biyolojik sensör, antibakteriyel materyal ve biyouyumlu skafoldların üretimi gibi biyomedikal uygulamalarda da önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir [2]. Liu ve ark. [3], grafen nanoplakaları hidroksiapatite (HA) ekleyerek mukavemetin önemli ölçüde artırılabilceğini ayrıca hidroksiapatit-grafen nanoplaka kompozitlerinin HA'nın biyolojik özelliklerini arttırdığı ve biyomedikal uygulamalar için önemli bir potansiyel olduğunu göstermişlerdir [3].

Biyoaktif camlar, kemik doku ve yumuşak dokunun onarımı ve rejenerasyonunda kullanılan malzemelerdendir. Biyoaktif camların yüzeylerinde meydana gelen kimyasal reaksiyonlar sayesinde hidroksiapatit benzeri tabaka oluşmakta ve dokuyla güçlü bağlar kurulabilmektedir [4]. Biyoaktif camların kronolojisi Hench'in [4] keşfi olan 45S5 Biyocam®'la başlamış ve ardından yapılan pek çok çalışmayla farklı kompozisyonlar halinde geniş bir yelpazeye yayılmıştır. 13-93B3 olarak adlandırılan ve temeli B_2O_3 olan bor bazlı biyoaktif cam ise bu yelpazedeki en önemli malzemelerden biridir. Biyomedikal uygulamalar için oldukça

iyi özelliklere sahip olan bu malzeme ayrıca elektriksel olarak yalıtkandır. Kemik rejenerasyonunu diğer biyoaktif seramiklere nazaran daha fazla teşvik ettikleri daha önce bildirilmiştir [5]. Silika bazlı 13-93 biyoaktif cam bileşimi (mol% cinsinden %54,6 SiO₂, %22,1 CaO, %7,9 K₂O, %7,7 MgO, %6,0 Na₂O ve %1,7 P₂O₅) ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Bor bazlı 13-93B3 cam, 13-93 biyoaktif camın bileşiminde bulunan SiO₂'nin B₂O₃ ile yer değiştirmesiyle elde edilmiştir [6]. Her iki biyoaktif cam da biyomedikal uygulamalar için uygun özelliklere sahip olmakla birlikte, elektriksel iletkenlik açısından yalıtkan malzemelerdir. Grafen gibi elektriksel olarak iletken bir malzeme ilavesi ile hücrelerin elektrik stimülasyon metoduyla büyümesi için elektriksel olarak iletken skafoldlar hazırlanması, biyoaktif camların muhtemel uygulamalarını genişletebilir. İletken polimerler, karbon nanotüpler ve grafen gibi elektriksel olarak iletken malzemelerle özel nişlerin yapımının, elektro-aktif soylara doğru kök hücre farklılaşmasını teşvik edebileceği ve bunun elektro-aktif doku rejenerasyonunda kök hücrelerin umut vaat eden rolünü desteklediği gösterilmiştir [7].

Daha önce, Touri ve ark. [8] freeze-casting (dondurarak döküm) yöntemi ile çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT)/45S5 biyoaktif cam kompozit skafold hazırlamışlardır. %100 45S5 biyoaktif cam tozları ile hazırlanan skafoldlara kıyasla, %0,25 MWCNT ilavesi, 45S5 biyoaktif cam skafoldun basma dayanımını 2,08'den 4,56 MPa değerine çıkarmıştır. Benzer şekilde, Fabbri ve ark. [9] grafen içeren 45S5 biyoaktif camları incelemişlerdir. Polimer köpük replikasyonu yöntemini kullanarak 45S5 cam skafoldlar üretmiş ve skafoldları grafen katmanı ile kaplamışlardır. Sonuçlar, grafen kaplamanın skafoldun elektrik iletkenliğini arttırdığını ve bununla beraber camın biyoaktivitesini olumsuz etkilemediğini ortaya koymuştur. Liu ve ark. [10] MWCNT'lerle güçlendirilmiş 13-93 biyoaktif cam nano kompozit skafoldları araştırmışlardır. Sonuçlar, CNT'lerin, biyoaktivitede bir kayıp olmaksızın skafoldların mekanik özelliklerini geliştirmede etkili olduğunu göstermiştir. Fan ve ark. [11] biyoaktif cam-grafen kompozitleri hazırlamışlardır. Yapıya grafen ilave edilmesi daha yüksek sertlik ve Young modülü elde edilmesini sağlamıştır. Dahası, grafen içeren cam skafoldlar, *in vitro* olarak daha yüksek hücre çoğalması göstermişlerdir. Gao ve ark. [12], grafen içeren silika bazlı nano-58S biyoaktif cam skafoldların mekanik ve biyolojik performansını araştırmıştır. Grafenin kullanılmasının, nano-58S biyoaktif camın kemik onarımı ve rejenerasyonu için

mekanik özelliklerini geliştirdiği görülmüştür. Porwal ve ark. [13], 45S5 Biyocam-grafen nanotoz bileşiklerinin işlenmesi ve biyoaktivitesini incelemiştir. Sonuçlar, grafen nanotozlarının biyoaktiviteyi etkilemeksizin kompozitlerin elektriksel iletkenliğini arttırdığını ve böylece kemik doku mühendisliği için biyoaktif ve elektriksel iletkenliğe sahip skafoldlar hazırlanmasına olanak verdiğini göstermiştir. Her ne kadar grafen-biyoaktif cam kompozitler daha önce çalışılmış olsa da, bildiğimiz kadarıyla, bor bazlı biyoaktif cam kompozisyonu üzerine yayınlanmış çalışma bulunmamaktadır.

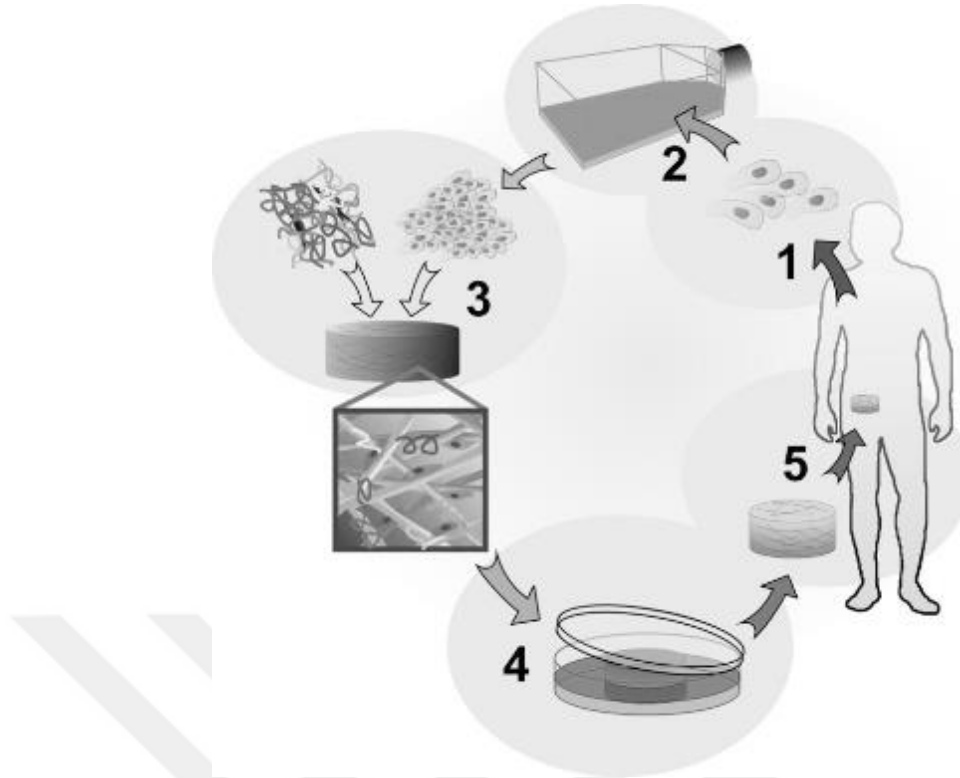
Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda grafen içeren elektriksel iletken, gözenekli, bor bazlı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların hazırlanması ve hazırlanan kompozit skafoldların fiziksel ve biyolojik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda skafold içerisine grafenin eklenmesi 2 farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Elektriksel iletken grafen-biyoaktif cam skafold imal etmede ana fikir, kemik doku mühendisliği uygulamalarında, piezoelektrik sinyal aktarımı ile hücre büyümesini ve doku rejenerasyonunu kolaylaştırmaktır. Bu şekilde üretilen skafoldların canlı dokulara implantasyonundan sonra elektriksel stimülasyon etkisi ile hasarlı dokularda iyileşme sürecinin hızlandırılabilceği düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, mühendislik prensipleri ve yaşam bilimlerinin sinerjik bir şekilde birleştirilmesi ile vücutta kaza, kanser veya travma sonucu oluşan işlevsel eksikliklerin giderilmesi ya da tedavi edilmesi için hücrelerin, mühendislik malzemelerinin ve gerekli biyosinyallerin bir araya getirilerek kullanılması olarak tanımlanmaktadır [14, 15]. Doku mühendisliğinin hedefi hakkında en başarılı yaklaşımlardan biri; hasar görmüş ya da işlevini kaybetmiş dokularda, hücre entegrasyonunun, farklılaşmasının ve çoğalmasının doğal kapasitesine yeniden ulaşabilmesini teşvik eden bir ortam hazırlanarak yaşayan dokularla yer değiştirilmesi ya da dokunun onarılması uygulamasını içerir [16]. Bu yaklaşım, doku gelişimiyle ilgili olan tüm karmaşık yapıyı yeniden üretmek değil, doğal kapasitelerini yeniden kazanmaları amacıyla teşvik edici bir ortamda yeni hücrelerin ve dokuların bir araya getirilmesini amaçlamaktadır. Öncü hücreler ve kök hücreler, bu yaklaşımın bir parçası olarak doku iskelelerini (skafold) geliştirmede kritik bir rol oynamaktadır [17].

Transplantasyon için mevcut organların sayısı, bu prosedürlere ihtiyaç duyan hasta sayısının çok gerisinde kalmıştır. Yalnızca 2000 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde, son aşama organ yetmezliği nedeniyle yaklaşık 72000 kişi bir organ nakli için bekleme listesinde yer almıştır ancak sadece 23000 nakil gerçekleştirilmiştir [17]. 2003 ve 2012 yılları arasındaki on yıl boyunca İngiltere, organ bağıışı ve transplantasyonun sağlanmasında gelişme kaydetse de yetişkin hastalarda transplantasyon için ortalama bekleme sürelerinin böbrek, pankreas, karaciğer, kalp ve akciğer için sırasıyla 1167, 339, 141, 293 ve 311 gün olduğu belirtilmiştir [18]. Organ bağıışında ve buna bağılı nakillerde yaşanan bu yetersizlik, hastalıkların tedavisinde doku mühendisliğinin kullanımının önemini arttırmış ve doku mühendisliği çalışmalarına ağırlık verilmesini sağlamıştır. Doku mühendisliği uygulaması şematik olarak Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Doku mühendisliği uygulamasını gösteren şematik; (1) hastadan alınan kaynak hücre, (2) *in vitro* ortamda hücrelerin çoğaltılması, (3) skafold üzerine hücrelerin ekilmesi, (4) *in vitro* oluşturulan kültür ortamıyla dokunun büyümesi, (5) hastaya implantasyon [19].

Malzeme mühendisliği açısından, dokular, çok fazlı sistemleri temsil eden hücresel kompozitler olarak düşünülür. Hücresel kompozitler üç ana yapısal bileşenden oluşur. Bunlar; fonksiyonel birimler halinde düzenlenen hücreler, hücre dışı matris ve skafoldlardır [20].

Tüm hücreler, sürekli olarak ya da hayatlarının önemli evrelerinde (örneğin, kök ya da öncü hücreler olarak ya da hücre göçü sırasında) hücre dışı matrisle (ECM) sıkı temas kurarlar. ECM, organ ve dokulara yapısal destek sağlama yeteneğiyle bilinmektedir. Ayrıca hücre katmanları için bazal zar ya da tekil hücrelere göç için substrat görevi de görmektedir. Hücre dışı matrislerin hücre tutunmasında ve tutunma reseptörleri vasıtasıyla hücrelere sinyal vermesindeki rolleri dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalarla matrisin mekanik özelliklerinin de (sertlik, deforme olabilme gibi) hücre davranışını etkilediği görülmüştür [21]. Biyolojik dokular, oksijen veya besin arzı için entegre bir vasküler sistem ile birlikte karmaşık bir moleküler çerçeve içerisinde yer alan hücrelerden oluşur. Çoğu ECM

makromoleküllerin üç genel sınıfından oluşur: kolajenler, proteoglikanlar/glikozaminoglikanlar ve fibronektin, laminin gibi glikoproteinler [22]. Yapısal destek ve sinyal vermenin yanı sıra birçok ECM molekülünün önemli bir rolü, çözünebilir büyüme faktörleri için çoklu bağlanma alanlarının sağlanmasıdır. Bu yapıyı taklit etmek için 3 boyutlu (3B) skafoldların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin son derece önemli olduğu açıktır. Genel olarak ideal bir skafolddan biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilir olması, oksijen, besin ve atık transferinin sağlanabilmesi için uygun boyutlar, şekil ve porozite oranı, doku büyümesini yönlendirmek ve bağışıklık reddini engellemek için uygun kimyasal sinyalleri sağlaması gibi pek çok özellik beklenmektedir [23].

2.1.1. Kemik Doku Mühendisliği

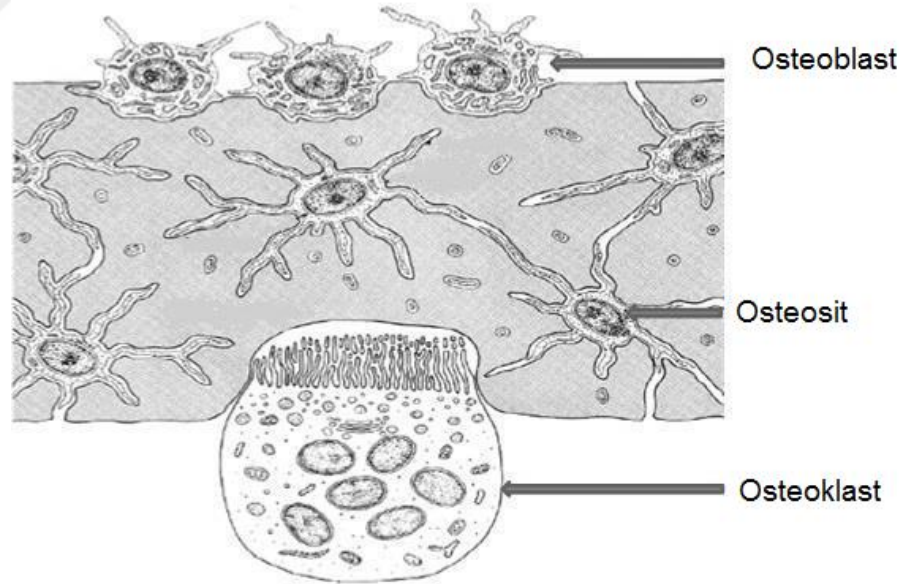
Kemiklerin en önemli yapı taşı oluşturduğu iskelet sisteminin iç organları korumak, hareket sağlayıcı kasların yapışmasını sağlamak ve yük taşımak gibi çok önemli görevleri bulunmaktadır. Kırıklar ve hastalıklar gibi çeşitli etmenlerin kemiğe zarar vermesi bu işlerin aksamasına ve hayat standardının düşmesine sebep olmaktadır. Kırıklar, kemiklerin biyomekanik olarak yetersiz kalmaları sonucu yani taşıyabilecekleri maksimum yük kapasitesinin aşılması sonucu oluşmaktadır [24].

Kemik, genel çerçeveyi sağlayan kolajen ve dayanıklılığı sağlayan kemik mineralinden oluşan doğal bir kompozittir. En önemli iki kemik türü kortikal (kompakt) ve süngerimsi (trabeküler) kemiktir. Kortikal kemik yoğun yapıya ve yüksek mekanik mukavemete sahiptir (basma dayanımı = 100MPa – 200 MPa [25]). Süngerimsi ya da trabeküler kemik, femur gibi uzun kemiklerde ya da kısa kemiklerde kortikal kemiğin sınırları içinde bulunan içi gözenekli bir destek yapısındadır (basma dayanımı = maksimum 12 MPa) [25]. Trabeküler kemik, büyük boşlukları (makroporlar) çevreleyen destek (trabekülü) ağıdır [26]. Kemiğin kemik hücrelerinden, hidroksiapatit kristallerinden ve kolajen temelli yapıdan oluşan yapısal bir hiyerarşisi bulunmaktadır. Bu bileşenlerin farklı şekillerle bir araya gelmesiyle trabeküler ve kortikal kemikler oluşmaktadır. Kemikte oluşan kırık veya hasar durumunda kemik kendisini üç aşamada tamir etmektedir. Hasar sonrası ilk aşamada osteoprogenitör hücreler hematoma içinde sentezlenen büyüme faktörleri sayesinde defekt bölgesine göç ederler ve bu bölgede osteoblastların ve kondroblastların farklılaşmasını sağlayarak rejenerasyon sürecini düzenlerler [27].

Kemik doku hücreleri, mezenkimal ve hematopoitik olarak iki farklı grupta değerlendirilebilirler [28].

1. Mezenkimal temelli hücreler kemik oluşumundan sorumludurlar.
 - a. Osteojenik hücreler, kemik hücrelerine dönüşmesi yönünde koşullanan mezenkimal hücrelerdir.
 - b. Osteoblastlar kemiğin oluşumundan ve kemikteki matris yapıda bulunan organik kısmın sentezinden sorumludurlar.
 - c. Osteositler osteoblast hücrelerinin olgunlaşıp farklılaşmasıyla oluşan kemik hücreleridir. Kemik yapısındaki hücrelerin neredeyse tamamını oluştururlar.
2. Kemik yıkımdan sorumlu olan hücreler hematopoitik hücrelerdir.
 - a. Osteoklastlar, kemiğin rejenerasyon sürecinde çözülerek çevredeki dokular tarafından emilmesinden sorumlu olan hücrelerdir [28, 29].

Kemik dokuda yer alan hücrelerin şematik gösterimi şekil 2.2.'de verilmektedir.



Şekil 2.2. Kemik dokuda yer alan kemik hücrelerinin şematik gösterimi [28].

2.1.1.1. Kemik Doku Mühendisliğinde Skafoldların Önemi

Hastalıklı veya hasar görmüş dokuları orijinal durumuna ve işlevine geri döndürmenin bir yolu, doku mühendisliği kapsamında laboratuvarında hazırlanan

skafoldların kullanılmasıdır. Tipik bir kemik doku mühendisliği uygulamasında, hücreler hastadan toplanır (örneğin kemikteki osteojenik hücreler) ve üç boyutlu doku büyümesi için rehber ve uyarıcı görevi gören sentetik bir skafold üzerine ekilir ve canlı biyokompozit oluşturulur. Biyokompozit daha sonra tekrar hastaya implante edilir [26, 30]. Zamanla, sentetik skafold, hücrelerin kendi hücre dışı matrislerini ürettikleri oranda toksik olmayan parçalanma ürünleri vererek vücutta degrades olur. Skafold yapısının, uygulandığı hasarlı dokunun yapısı ile uyumlu olması gerekir. Örneğin, trabeküler kemiği rejenere edebilmek için, trabeküler kemiğin yapısını taklit edecek ve osteojenik hücreler (osteoblastlar) ile kültürlendiğinde yeni kemik büyümesini uyuracak bir yapı gereklidir [26].

İdeal bir skafold, hücrelerin üzerine tutunup çoğalabilmesi, taşınabilmesi ve işlev görmesi için hazırlanan ve dokunun hücre dışı matrisini taklit eden bir iskeledir. Kemik rejenerasyonu için ideal bir skafoldun sahip olması gereken kriterler şunlardır [26, 31–34]:

- Biyolojik olarak uyumlu, yani sitotoksik olmayan bir malzemeden yapılmış olması,
- Üç boyutlu doku büyümesi için şablon gibi davranabilmesi,
- Hücre penetrasyonu, doku büyümesi ve vaskülarizasyon için 100 µm'den daha büyük çaplara sahip gözenekleri içeren, birbirine bağlı makro gözenekli bir ağa sahip olması ve implante edildiğinde rejenerasyon dokusunun merkezine besin maddesinin taşınabilmesi,
- Kolaylıkla konak dokuya bağlanabilmesi için osteokondüktif bir malzemeden yapılması,
- Hücre yapışmasını, biyolojik metabolitlerin emilimini teşvik eden bir yüzey dokusu sergilemesi,
- Etkili hücre farklılaşması ve çoğalmasını sağlamak için kemik üreten hücrelerdeki genleri etkilemesi,
- Toksik olmayan ve vücut tarafından kolayca atılabilen bozunma ürünleri salması örneğin solunum sistemi veya idrar yolu sistemi vasıtasıyla vücuttan uzaklaştırılabilen ve doku tamir hızıyla aynı hızla emilimin sağlanabilmesi,
- Doku büyümesini yönlendirmek ve bağışıklık reddini önlemek için uygun kimyasal sinyalleri sağlayabilmesi,

- Sterilize edilebilir olması,
- Yük taşıyan alanlardaki kemikler gibi belirli uygulamalarda dokuyu yenilemek için yeterli mekanik özellikleri gösterebilmesi,
- Uygulandığı bölgenin morfolojisi ve mekanik özellikleri ile uyumlu olması,
- Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) veya Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) standartlarına göre ticari olarak üretilebilecek potansiyele sahip olmaları beklenmektedir.

Kemik rejenerasyonunda gözenekli yapının gerekliliği Kuboki ve ark. [35] tarafından da gösterilmiştir. Yaptıkları çalışmada gözeneksiz ve gözenekli olmak üzere iki farklı hidroksiapatit (HA) yapıya BMP-2 (Bone morphogenetic protein) eklenmiştir, gözenekli yapıda kemik oluşumu gözlenirken, gözeneksiz HA yapıda yeni kemik oluşumu görülmemiştir.

Makro gözeneklilik (gözenek boyutu $>50\mu\text{m}$) osteojenik sonuçlar üzerinde güçlü bir etkiye sahip olsa da, mikro gözeneklilik (gözenek boyutu $<10\ \mu\text{m}$) ve gözenek duvarı pürüzlülüğünün de önemli bir rolü vardır. Ortalama gözenek boyutu $200\ \mu\text{m}$ olan, pürüzsüz ve yoğun gözenekli duvarlara sahip hidroksiapatit seramik çubuklar $400\ \mu\text{m}$ 'lik ortalama gözenek boyutu ile aynı malzemeden yapılmış ancak kaba ve gözenekli duvarlara sahip olan çubukların aksine, köpeklerde ektopik kemik oluşumunu başlatamamıştır [36]. Mikro gözeneklilik, skafoldun daha büyük yüzey alanına sahip olmasını sağlar bu sayede hem yüksek kemik indükleyici protein emilimine hem de emilimi ve yeniden çözünmesi sayesinde iyon değişimine ve kemik benzeri apatit yapı oluşumuna yardımcı olur. Yüzey pürüzlülüğü tutunma-bağımlı kemik oluşturma hücrelerinin bağlanma, proliferasyon ve difüzyonunu artırır [37].

2.2. Biyomalzemeler

Biyomalzeme, tıbbi amaç içeren herhangi bir uygulamada kullanılan ve bu amaçla tasarlanmış her türlü malzemeye verilen genel bir addır. Daha detaylı bir tanımlaması şöyledir: biyomalzemeler, ilaçların dışındaki madde veya madde bileşenlerinin oluşturduğu yapay veya doğal temelli, belirli bir zaman aralığında bir sistemin tümünde veya bir kısmında iyileştirici olarak kullanılan organ ve dokuların veya vücuttaki bir fonksiyonun yerini tutan malzemelerdir [38]. Araştırmacılar, “biyomalzeme” ve “biyouyumluluk” terimlerini, malzemelerin biyolojik performanslarını belirtmek için kullanmışlardır. Biyouyumlu olan malzemeler, biyomalzeme olarak adlandırılmış ve biyouyumluluk; uygulama sırasında malzemenin vücut sistemine uygun cevap verebilme yeteneği olarak tanımlanmıştır. Biyouyumluluk, bir biyomalzemenin en önemli özelliğidir. Biyouyumlu, yani ‘vücutla uyuşabilir’ bir biyomalzeme, kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı oluşumu, vb) meydana getirmeyen malzemedir. Biyomalzemeler, hücre içi büyüme, proliferasyon ve üç boyutlu yeni doku oluşumu için matrisler sunarak doku mühendisliğinde önemli bir rol oynamaktadır [39, 40]. Biyomalzemeler, metaller, polimerler, seramik ve camlar olarak sınıflandırılabilir.

2.2.1. Metaller ve Alaşımlar

Metalik biyomalzemeler iskelet sisteminin ihtiyaç duyduğu mekanik koşulları karşılama konusunda en başarılı malzemelerin başında gelmektedirler. Uzun süreli, ağır, ani ve değişken yüklemelere karşı dayanabilmeleri ve özelliklerini kaybetmemeleri sebebiyle metalik biyomalzemeler tercih edilmektedirler. Vücut ortamının oldukça korozyif bir yapıya sahip olması, metallerin vücut içinde korozyona uğramalarına ve bunun sonucunda hücrelere zarar vermelerine sebep olmaktadır. Aynı zamanda metaller, biyouyumluluklarının düşük olması, dokulara göre oldukça sert olmaları ve yüksek yoğunluklara sahip olmaları gibi önemli dezavantajlara da sahiptirler. Buna rağmen metaller biyomalzeme olarak büyük bir öneme sahiptirler. Güçlü metalik bağları ve kristal yapıları sayesinde çok iyi mekanik özelliklere sahip olan titanyum ve titanyum alaşımları, paslanmaz çelikler, altın ve platin gibi metal ve metal alaşımlarının bu alandaki payı büyüktür. Metalik biyomalzemeler, eklem protezi, çene ve diş implantı, kemik rejenerasyon malzemesi ve yapay kalp parçaları

gibi çeşitli alanlarda kendisine yer bulmaktadır. Biyomedikal cihazların üretiminde de metalik biyomalzemeler tercih edilmektedir [41, 42].

2.2.2. Polimerler

Polimer, “mer” adı verilen birimlerin uzun zincirler şeklinde tekrarlanarak bağlanması sonucu oluşan moleküllerdir. Polimerler zincirleri doğrusal yapıda olabilecekleri gibi diğer zincirlerle yan dal olarak bağlanmalarıyla “dallanmış” yapıda da olabilirler. Polimerlerin biyomalzeme olarak kullanım alanları oldukça geniştir, bunun sebebi olarak polimerlerin sahip oldukları özelliklerin geniş bir skalada değişebiliyor olması gösterilebilir. Biyopolimerler, biyo inert veya biyobozunur olabilirler. Kemik doku tedavilerinde kemikle bağlanamadıkları ve düşük mekanik dayanım sebebiyle dezavantajlıdır. Ancak biyoseramik-polimer kompozitler skafold olarak kullanılmaktadır. Seramik-polimer birlikteliğiyle polimerlerin sahip olduğu dayanım artırılmakta ayrıca malzeme biyobozunur özelliğinin yanında biyoaktiflik de kazanmaktadır [26, 43].

Polimerler, kemikten çok daha düşük bir Young modülüne sahiptir ve direk olarak yük taşıyıcı uygulamalarda kullanılamazlar (30). Polimerler doğal ve sentetik olmak üzere iki sınıfa ayrılır.

2.2.2.1. Doğal Polimerler

Doğal polimerler, doku yenileme uygulamalarında düşük antijen üretimi, biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi avantajlara sahiptirler. Toksik etkiye sahip değildirler ve canlı hücreler ile etkileşim gösterirler [37, 44]. Nisasta, alginat, kitin/kitosan, kollajen ve elastin doğal polimerlere örnek verilebilirler. Doğal polimerlerin biyoyum özellikleri ve hücre ile etkileşimleri çok yüksektir ancak mekanik özellikleri çoğu zaman yetersiz kalmaktadır ayrıca şekil verilmesi hususunda da kısıtlamaları bulunmaktadır [43].

2.2.2.2. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerlerin üretimi kontrollü bir şekilde yapılabilmektedir. Bu sayede üretilecek olan malzemenin mekanik ve fiziksel özellikleri (esneklik katsayısı, gerilme mukavemeti ve degradasyon oranı gibi) daha önceden öngörülebilir. Bu şekilde sentezlenen polimer daha sonradan aynı şartlar altında tekrar üretilebilir. Polimerler medikal uygulamalarda da

kullanılmaktadır. Gözeneklilik, gözenek boyutu şekil, bozunma hızı, mekanik özellikleri ve malzemenin safsızlığı gibi özelliklerin ayarlanabiliyor olması doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere özel skafoldların hazırlanabilmesine olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki toksisite, immunojenite ve enfeksiyonun desteklenmesi gibi riskler saf sentetik polimerler için daha düşüktür [45]. Bu sebeple polimer sentezlenirken safsızlığının kontrol edilebiliyor olması gereklidir.

Doku mühendisliğinde kullanılmak üzere üretilen üç boyutlu skafoldlarda en çok sentetik polimer çeşidi olan doymuş alifatik poliesterler kullanılmaktadır. Bu grubun içeriğinde poli(laktid-ko-glikolit) (PLGA), poli(glikolik asit) (PGA) ve poli(laktik asit) (PLA) kopolimerleri ve poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) bulunur [46–48]. Bozunma hızlarına göre sıralanacak olurlarsa doymuş alifatik poliesterler, PGA > PLA > PCL şeklinde sıralanırlar [45]. Bu polimerler sahip oldukları kimyasal özellikler sayesinde esterleşme tepkimesiyle hidrolitik bozunma gerçekleştirirler. Bu parçalanma sonucu her polimerin monomerik bileşenleri doğal yollarla vücuttan uzaklaştırılabilir [45, 49].

2.2.2.2.1. Polikaprolakton (PCL)

Poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) yarı kristalli bir alifatik polyester olup, osteoblastlarla oldukça uyumludur. Kemik kusurlarının tedavisinde, kemik gelişimi ve yenilenmesini desteklemek amacıyla değerlendirilebilmektedir. PCL oldukça hidrofobiktir, dolayısıyla PLA'ya göre *in vivo* ortamda daha düşük biyobozunma oranına sahiptir [50]. Diğer bahsedilen poliesterlerde olduğu gibi, PCL'nin *in vivo* degradasyonu, ester bağlantılarının rastgele hidrolitik zincir parçalanmasını da içerir. Çok yüksek olmayan mekanik özelliklerine (gerilme modülü 200-440 MPa ve çekme mukavemeti 20-42 MPa) rağmen PCL, kemik ve kıkırdak doku mühendisliği için skafold hazırlanması gibi farklı biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır [47, 51]. Ayrıca PCL, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylıdır. Nispeten düşük erime noktasına bağlı olarak, PCL, geleneksel prosedürlerle kolayca işlenebilir. Bu nedenle, PCL kolayca sert malzemelerle (partiküller veya lifler) karıştırılabilir ve eritme teknikleri ile işlenebilir. Bu malzemenin en büyük dezavantajı ise bozunma hızının çok düşük olmasıdır [45, 47].

PCL oda sıcaklığında kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, toluen, sikloheksanon ve 2-nitropropan içinde çözünür. Aseton, 2-bütanon, etil asetat, dimetilformamid ve asetonitril içinde düşük bir çözünürlüğe sahiptir ve alkol, petrol eteri ve dietil eterde çözünmez. PCL, stres çatlama direncini ve yapışmayı iyileştirmek için diğer polimerlerle harmanlanabilir [52].

2.2.3. Seramikler ve Camlar

Kemikler yaşın ilerlemesiyle yoğunluk ve mukavemet kaybı yaşarlar. Bunun sonucu olarak yaşlı insanların kemikleri kırılmaya karşı çok daha savunmasız olmaktadır. Ortalama insan ömrü 80 sene kabul edilirse ve implant ihtiyacının vücut tarafından 60 yaş civarında ortaya çıkarıldığı düşünülürse yerleştirilecek malzemenin vücutta +20 yıl geçirebilmesi gerekmektedir [53].

Biyoseramiğin bekası için malzemenin canlı konak doku ile arasında stabil bir ara yüz oluşturması gerekmektedir. Dokunun bağlanma mekanizması dokunun ara yüze nasıl yanıt vereceğiyle alakalıdır. Dört farklı yanıt türünden bahsedilebilir [54]:

- Kullanılan malzemenin toksik olması durumunda doku ölür.
- Malzeme toksik değil ancak biyolojik olarak inert ise değişen kalınlıklarda fibröz tabaka oluşur.
- Malzeme toksik değil ve biyolojik açıdan aktif (biyoaktif) ise, arayüz bağı oluşur.
- Malzeme toksik değil ve vücut içerisinde çözünürse, kendisini çevreleyen dokuyla yer değiştirir.

Bu yanıt türleri iskelet sisteminde farklı türlerde implantlar kullanılmasını neden olmaktadır. Ara yüzey oluşma hızı biyoaktifliğin yüksek olması durumunda artmaktadır bununla birlikte implantın vücut içerisinde kaldığı süre biyoaktiflikle ters orantılı şekilde artmaktadır [54].

Mikro gözenekli biyoseramiklerde doku, yüzeyin veya implantın gözeneklerinden infiltre olur ve büyürler. Bu durum implant ile doku arasında arayüz alanının artmasını sağlar ve bunun sonucunda da doku içerisindeki harekete karşı direnç artmış olur. Bu arayüz gözeneklerdeki canlı doku tarafından oluşturulur. Bu bağlanma yöntemine biyolojik fiksasyon denir. Biyolojik fiksasyon, sadece

morfolojik fiksasyon sağlayan implantlardan çok daha karmaşık gerilmelere dayanabilir. Skafoldların sahip olduğu kısıtlama ise gözenek boyutunun en az 100-150 mikrometre çapında olması gerekliliğidir. Gözenek boyutundaki bu kısıtlama gözenek içerisine doğru büyüyen dokunun ihtiyaı olan kan tedarikinin sağlanabilmesi içindir. Vasküler yapı gözenek boyutunun 100 mikrometreden az olduğu durumlarda görülmez [53, 55].

2.2.3.1. Biyo inert Seramikler

Malzeme, inert özellik gösterdiğinde ara yüzey ne biyolojik ne de kimyasal olarak bağlanmaz. Hem sert hem de yumuşak dokuyla bağ kurmamış bağlı hareket edebilen ve yapışık olmayan lifli bir yapı gelişir. Biyomalzemeler ile doku arasında hareket bulunması sonunda implantın veya dokunun ara yüzeyinde veya her ikisinde işlevinde bozulmaya sebep olur [54].

Yüksek yoğunluğa sahip ve yüksek saflıktaki (%99,5) Al_2O_3 , klinik olarak yaygın şekilde kullanılan ilk biyoseramiktir. Bu malzemenin sahip olduğu yüksek aşınma direnci, mkemmekorozyon direnci, yüksek mukavemet ve iyi biyoyumluluğu sayesinde kalça protezi ve diş implantlarında kullanılmaktadır. Çoğunlukla ince taneli polikristalin $\alpha-Al_2O_3$ kullanılır. Sinterleme işleminde tane büyümesini sınırlandırabilmek için malzemenin içerisine düşük konsantrasyonda MgO eklenebilir. Malzemenin sahip olduğu mukavemet, kırılma tokluğu ve yorulma direnci gibi mekanik özellikler malzeme saflığının ve kullanılan tozun tane boyutunun bir fonksiyonu olarak değişkenlik gösterir. Bu malzemenin diğer kullanım alanları diz protezleri, orta kulak kemik ikameleri, kemik vidaları gibi klinik uygulamalardır [56].

Tıbbi uygulamalarda kullanılan bir diğer biyoseramik ise tetragonal formda, magnezyum ya da yitrium ile stabilize edilmiş zirkonyum dioksittir (ZrO_2). Bu malzemenin tercih edilmesini sağlayan özellikleri gerilme direnci ve yüksek kırılma tokluğudur. Al_2O_3 'e göre gelişmiş olan bu özellikleri sayesinde kalça protezlerinde kullanılabilen mekanik dayanımı daha yüksek femur implantları yapılabilmektedir [55, 56].

2.2.3.2. Biyoaktif Seramikler

Ara yüzeyde yapışma sorununun üstesinden gelebilmek için biyolojik olarak aktif malzemeler kullanılabilir. Bu malzemeler ara yüzeyde biyolojik bir tepkimeye yol açarlar ve bunun sonucunda doku ile malzeme arasında bir bağ kurulmasını sağlar [55].

2.2.3.3. Biyobozunur Seramikler

Çözünebilen biyomalzemeler, vücut içerisinde zamanla kademeli olarak degrades olur ve doğal konak doku ile yer değiştirirler. Bu durum ara yüzeyin oluşmamasına veya çok ince bir tabakanın oluşmasına neden olur [57]. Gerekli mukavemet değerleri ve kısa süreli performans değerleri sağlanabiliyorsa bu malzemeler en uygun çözümlerdir. Doğal dokular kendilerini onarabilirler ve vücut içerisindeki hücre popülasyonunun sürekli devri ile kademeli olarak değişirler. Malzemenin emilmesi sürecinde arayüzün mukavemet ve istikrarının korunması ayrıca doku tamir sürecindeki emilme hızının sağlığa, yaşa ve doku türüne bağlı olarak geniş bir aralıkta değişebiliyor olması bu malzemeler için kısıtlamalardır. Bazı emilebilir malzemeler çok hızlı bazıları ise çok yavaş çözülür. Büyük miktarlarda malzeme çözüldüğü için emilebilir bir biyomalzemenin tamamen metabolik olarak kabul edilebilir maddelerden oluşması gerekmektedir. Bu durum emilebilir biyomalzemelerin kompozisyonu için büyük bir kısıtlama getirmektedir. Trikalsiyum fosfat (TCP) gibi kalsiyum fosfat temelli seramik malzemeler çene ve kafatası gibi düşük mukavemet gerektiren bölgelerde emilebilir biyoseramik olarak kullanılabilir [55, 57].

2.3. Biyoaktif Camlar

Biyoaktif cam, vücuda yerleştirildiğinde, yumuşak ve sert dokuyla güçlü bir bağ kurabilen, hidroksiapatit tabakalarının oluşmasını sağlayan spesifik yüzey reaksiyonları geçiren cam malzemelerdir. Camın, fizyolojik sıvılar içerisinde HA benzeri tabaka oluşturması biyoaktivite olarak kabul edilir [58].

2.3.1. Silika Bazlı Biyoaktif Camlar

İlk biyoaktif cam kompozisyonu 1969 senesinde Hench ve ark. tarafından geliştirilmiştir ve formülü ağırlıkça %45 SiO₂, %24,5 Na₂O, %24,5 CaO ve %6 P₂O₅ şeklindedir. Malzeme sahip olduğu yüksek biyoaktiflik ve kompozisyonu sebebiyle

45S5 Bioglass® ismini almıştır. Bu kod, malzemenin içerisinde bulunan ağırlıkça %45 SiO₂ ve CaO/P₂O₅ oranının 5 olmasından gelir [59].

45S5 biyoaktif cam kompozisyonunda 3 temel kıstas mevcuttur. Bunlar; kompozisyonda bulunan SiO₂ oranının %60'dan düşük olması, Na₂O ve CaO oranlarının yüksek olması ve CaO/P₂O₅ oranının yüksek olmasıdır. Bu kriterlerin sağlanması camın yüzeyini oldukça reaktif yapmaktadır. CaO/P₂O₅ oranının 5'ten küçük olması kemiğe bağlanamamaya sebep olur [38].

Biyoaktif camları diğer biyoaktif seramiklerden ayıran temel özellik yüzeyinde oluşan ve dokularla bağ kurabilen “hidroksikarbonat apatit (HCA)” tabakasıdır. Bu tabakanın oluşumu biyoaktif camın yapısında bulunan silika gruplarının vücut içerisindeki kalsiyum ve fosforla yer değiştirmesiyle olur. Bu sayede biyoaktif cam kemik dokuyla sağlam bir bağ kurmayı başarır. Biyoaktif camın en önemli özelliklerinden biri kimyasal özelliklerinin ve dokularla bağlanmasının kontrol edilebilir olmasıdır. Farklı uygulamalar için istenilen türde biyoaktif cam sentezlenebilir [38].

45S5 camın vücut sıvısıyla temas halindeyken yüzeyinde oluşan HCA tabakası kemiğin mineral yapısıyla benzeşmesi, canlı kemik dokuyla bağlanmasına olanak sağlamaktadır. HCA tabakasını oluşturan kimyasal reaksiyonlar genel olarak şu şekildedir:

Artan Zaman	Aşama	Reaksiyon
	11	Matrisin kristallenmesi
	10	Matrisin oluşumu
	9	Gövde hücrelerinin değişimi
	8	Gövde hücrelerinin bağlanması
	7	Makrofazların hareketi
	6	Biyolojik partiküllerin tutulması
	5	Kalsiyum fosfatın (ACP) HCA'ya çekirdeklenmesi ve kristallenmesi
	4	Amorf kalsiyum fosfatın çökmesi
	3	Yüzeydeki silikanın çözünmesi ve Si-O-Si bağlarının oluşması
	1 & 2	Na ⁺ ve silanol (SiOH) iyonlarının oluşumu

Şekil 2.3. Biyoaktif cam yüzeyinde hidroksiapatit tabakasının oluşumu sırasında gerçekleşen kimyasal reaksiyonları gösteren şematik [58].

Cam yüzeyinin dokularla bağ kurmasını sağlayan HCA tabakası 1-5 arasında gösterilen reaksiyon basamaklarıyla oluşmaktadır [54]. Diğer yandan her bir aşamada yer alan reaksiyonlar ve değişimler aşağıda verilmektedir [58]:

1. Çözelti içerisinde bulunan H⁺ iyonlarıyla Na⁺ ve Ca²⁺ (ağ düzenleyiciler) arasındaki ani iyon değişimi sonucunda silika grupları hidrolize uğrar ve cam yüzeyinde Si-OH grupları oluşur. Bu aşamada H⁺ iyonlarının tüketilmesiyle solüsyonun pH'ı artmaya başlar.

2. Ortam pH'nın artmasıyla SiO₂'ler silisik asit (Si(OH)₄) şeklinde çözelti içerisinde çözülürler ve bu durum da Si-OH gruplarının oluşumunun devam etmesine neden olur.
3. Na⁺ ve Ca²⁺ iyonları tükenen cam yüzeyinde SiO₂ bakımından zengin amorf bir tabakanın yoğunlaşması ve polimerizasyonu gerçekleşir.
4. Camın daha fazla çözünmesiyle camda ve solüsyonda bulunan (PO₄)³⁻ ve Ca²⁺ iyonları oluşan SiO₂ tabakasına yönelirler ve burada amorf kalsiyum fosfat (ACP) tabakası oluştururlar.
5. Cam çözülmeye devam eder, ACP katmanı solüsyonda bulunan (OH)⁻ ve (CO₃)²⁻ iyonlarıyla birleşerek HCA tabakası olarak kristalize olur.

Brink ve ark. [4] tarafından 45S5 biyoaktif camın kompozisyonu modifiye edilerek 13-93 olarak adlandırılan biyoaktif cam kompozisyonu hazırlanmıştır. Bu cam kompozisyonu 45S5'ten farklı olarak yapısında K₂O ve MgO gibi ağ düzenleyicileri barındırmaktadır ayrıca daha yüksek oranda SiO₂ içermektedir [4,55]. 13-93 silika bazlı cam 45S5 cama göre daha düşük kristalleşme eğilimine sahiptir [56]. 13-93 camın hem *in vitro* ortamda HA dönüşüm performansı hem de kemik hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemesi malzemenin biyoaktifliğinin kanıtı olarak gösterilmektedir [56,57]. Bu gösterdiği performans 13-93 camı doku mühendisliği uygulamaları için yüksek potansiyelli bir malzeme haline getirmektedir. Tablo 2.1.' de yaygın olarak kullanılan farklı biyoaktif camların kompozisyonları görülmektedir.

Tablo 2.1. Farklı biyoaktif cam kompozisyonlarına ait içerik tablosu [58].

	Kompozisyon (% w/w)						
	SiO ₂	B ₂ O ₃	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO
45S5	45	0	24,5	24,5	6	0	0
58S	58,2	0	32,6	0	9,2	0	0
13-93	53	0	20	6	4	12	5
13-93B1	34,4	19,9	19,5	5,8	3,8	11,7	4,9
13-93B3	0	56,6	18,5	5,5	3,7	11,1	4,6

Fu ve ark. [60] tarafından yapılan çalışmada polimer köpük replikasyonu ile silika bazlı (13-93) bioaktif cam skafoldlar üretilmiştir. Üretilen skafoldların

trabeküler kemik ile benzer mikro yapıya ve mekanik dayanıma sahip olduğu belirtilmiştir. MC3T3-E1 preosteoblast hücreleriyle gerçekleştirilen hücre kültürü sonucunda 13-93 skafoldların hücre tutunması ve çoğalmasını desteklediği görülmüştür. Hücreler, skafoldların hem dış yüzeylerinde hem de yapının içerisinde başarıyla tutunmuşlardır [60].

Brown ve ark. [61] 13-93 biyoaktif cam kullanarak cam fiber ve cam fiberlerin sinterlenmesiyle elde edilen üç boyutlu skafoldlar üretmişlerdir. MC3T3-E1 osteoblast hücreler kullanılarak hücre kültürü testleri gerçekleştirilmiş ve hücrelerin büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasının her iki malzeme türü tarafından da desteklendiği gösterilmiştir. 13-93 cam elyaf skafoldların süngerimsi kemikle benzer mekanik dayanımlara sahip olduğu ve orta dereceli yük altındaki bölgelerde kemik doku tedavisinde kullanılabilir potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir [61].

Fu ve ark. [62] yaptığı çalışmada 13-93 biyoaktif cam kullanılarak biri %85 porozite ve 100-500 µm poroz boyutlarına sahip trabeküler kemiği taklit eden gözenekli bir yapı diğeri de %65 porozite ve 90-110 µm gözenek boyutlu yönlendirilmiş gözenekli yapıya sahip iki farklı skafold yapısı üretmişlerdir. Skafoldlar deney hayvanlarının (fare) sırt bölgesine 4 haftalık süreyle implante edilmiştir. Daha sınırlı poroz yapısına sahip olmasına rağmen yönlendirilmiş poroz yapıları skafoldlar trabeküler skafoldlara nazaran daha iyi doku büyümesi sağlamışlardır. İmplantasyon öncesi skafoldlara mezenkimal kök hücre (MSC) ekimi yapılması trabeküler skafolddaki yumuşak doku miktarını ve her iki skafold grubundaki kemiksi tortu birikim miktarını büyük ölçüde geliştirdiği görülmüştür. Skafoldları çevreleyen doku ile iyi entegrasyonu gösteren bir dizi fibrovasküler doku (100-300 µm kalınlıkta) oluşmuştur. Sonuçlar göz önüne alındığında MSC eklenen trabeküler ve yönlendirilmiş skafoldların kemik tamirinde ve rejenerasyonunda önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür [62].

Kobalt iyonlarının, hipoksik koşullara sebep olmasıyla anjiyogenezi uyardığı bilinmektedir bu nedenle kemik dokusu mühendisliği yaklaşımlarında biyoaktif camlarla birlikte kullanılabilirliğini düşünen Hoppe ve ark. [63] kobalt içeren 13-93 skafoldlar hazırlamışlardır. MG-63 osteoblast hücreleri ve hDMECs insan dermal mikrovasküler endotel hücrelerini kullanarak kobalt içeren biyoaktif cam skafoldlara hücre testleri gerçekleştirmişlerdir. Osteoblast hücrelerle yapılan çalışma sonucunda

ağırlıkça %1 oranında CoO içeren yapıların biyoaktivitelerini koruduğu hatta bu malzemelere ekilen hücrelerde mitokondriyal aktivitelerin arttığı gözlemlenmiştir. CoO oranı ağırlıkça %5'e geldiğinde yapı toksik etki göstermiştir. Benzer sonuçlar hDMECs hücrelerde de gözlemlenmiş ve 13-93 ve %1CoO-1393 ürünlerinin iyi biyoaktiviteye sahip olduğu görülmüştür. %5 oranı bu hücreler için de toksik etki göstermiştir [63].

2.3.2. Bor Bazlı Biyoaktif Camlar

45S5 ve 13-93 gibi silika bazlı camlar mükemmel biyoaktifliğe sahip olmasına rağmen yüzey reaksiyonlarının yavaş gerçekleşmesi ve tam olarak HA'ya dönüşmemesi sebebiyle, *in vitro* çözünürlükleri sınırlıdır [64]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, farklı cam kompozisyonlarının da biyoaktif olduğunu göstermiştir. 45S5 ve 13-93 camlarda bulunan SiO₂'nin kısmen veya tamamen B₂O₃ ile yer değiştirmesi cam yapısının kimyasal olarak dayanıklılığının düşmesine ve camın daha hızlı ve tam bir şekilde HA'ya dönüşmesine yol açtığı belirlenmiştir [65–68]. Yapılan çalışmalarda yer değiştirme işlemi B0, B1, B2, B3 olmak üzere adımlara ayrılarak gerçekleştirilmiştir. B0'da tamamen SiO₂ iken B3'e gelindiğinde yapıdaki SiO₂ tamamen B₂O₃ ile yer değiştirmiştir. 13-93B3 biyoaktif cam kompozisyonu ilk kez Yao ve ark. [68] tarafından hazırlanmıştır. Bu camların HA dönüşüm süreci 45S5 ile benzerdir ancak 45S5 camın dönüşüm basamaklarından biri olan SiO₂'ce zengin katman oluşumu bu malzemede gerçekleşmemektedir [66]. Bor bazlı camların bozunma hızlarının ve biyoaktivitelerinin kontrol edilebiliyor olması bu malzemeyi kemik tedavilerinde kullanmak üzere potansiyel bir skafold malzemesi yapmaktadır.

Yapıdaki bütün SiO₂'nin B₂O₃ ile yer değiştirmesiyle elde edilen 45S5B1 kodlu bor bazlı camın, fosfat çözeltisi içerisinde HA dönüşümünü desteklediği keşfedilmiştir. Fare kaval kemiği üzerinde yapılan denemelerde 45S5B1 camlar, orijinal silika bazlı 45S5'e göre kemik oluşumuna daha hızlı tesir ettiği belirlenmiştir daha sonra yapılan denemelerde 45S5B1 camın insan mezenkimal kök hücrelerinin çoğalmalarını ve farklılaşmalarını desteklediği görülmüştür [69]. HA dönüşümleri ve buna bağlı olarak biyoaktiviteleri karşılaştırılan silika ve bor bazlı camlarda bor bazlı camın silika bazlı cama göre dönüşüm hızının 5 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir [70].

Bi ve ark. [71] mikroyapının kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Buna göre 1393B3 biyoaktif cam kullanarak trabeküler, lifli ve yönlendirilmiş gözenekli yapıda skafoldlar hazırlanmış ve fare calvaria defekti üzerinde 12 haftalık süreçte kemik rejenerasyon kabiliyetleri ölçülmüştür. Oluşan yeni kemik miktarı, trabeküler, yönlendirilmiş ve lifli mikroyapılar için toplam defekt alanının sırasıyla %33, %23 ve %15 olduğu bildirilmiştir. Ayrıca silika bazlı 45S5 biyoaktif cam parçacıklarından oluşan skafoldlarda yeni kemik oluşum yüzdesi %19 olmuştur. Bor bazlı biyoaktif cama ağırlıkça %0,4 oranında CuO ilave edilmiş ancak trabeküler ve yönlendirilmiş skafoldlarda kemik yenilenmesini etkilememiştir fakat fibröz skafoldlarda kemik yenilenmesini önemli oranda arttırdığı (%15 - %33) belirtilmiştir. Vasküler yapı oluşumu bütün skafoldlarda gözlemlenmiş ancak trabeküler skafoldlar, yönlendirilmiş ve elyafli skafoldlarla karşılaştırıldığında daha yüksek oran yakalamıştır. Üç skafoldun mikroyapısının da kemik rejenerasyonunu desteklediği ancak trabeküler yapının kemik oluşumunu daha fazla katkıda bulunduğ bildirilmiştir.

Liu. ve ark. [72] %70 poroziteye sahip ve gözenek boyutlarının 200-500 µm olduğu bor bazlı biyoaktif cam (% mol cinsinden bileşim: %6 Na₂O, %8 K₂O, %8 MgO, %22 CaO, %36 B₂O₃, %18 SiO₂, %2 P₂O₅) skafoldları polimer köpük replikasyonu metodunu kullanarak hazırlamışlardır. Skafoldları 0,02 M K₂HPO₄ solüsyonu içerisinde bekletmişlerdir. İlk 24 saat içerisinde skafoldta bulunan bor içeriğinin solüsyona karışmaya başladığı bildirilmiştir. 360 saat sonunda toplam bor miktarının yaklaşık %20 kadarının solüsyon içerisine geçtiği bildirilmiştir. MLO-A5 post-osteoblast hücrelerle yapılan hücre tutunması çalışmalarında skafoldların hücre tutunması ve çoğalmasını desteklediği belirtilmiştir.

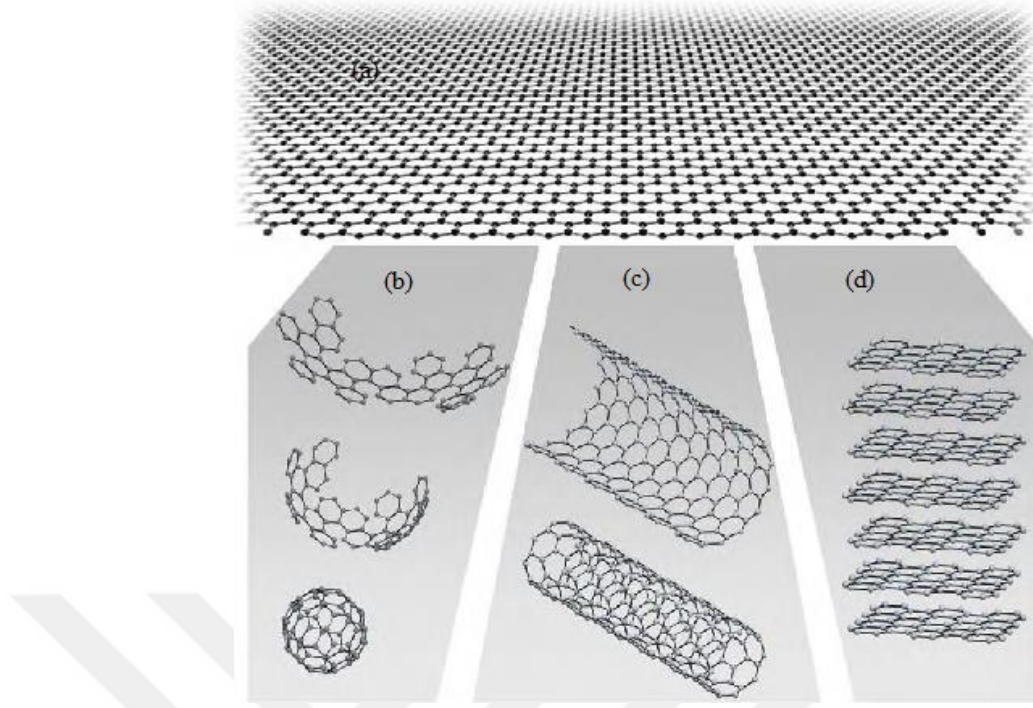
Bi ve ark. [73] tarafından karşılaştırmalı bir şekilde yapılan çalışmada 12 hafta süreyle farede bulunan kemik hasarına 45S5 (silikat), 13-93 (silikat), 13-93B1 (borosilikat) ve 13-93B3 (borat) biyoaktif camlarından yapılan farklı skafoldlar ekilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, bor bazlı 13-93B3 implante edilen kusur içinde yeni oluşan kemik hacmi, 1393 silikat camdan belirgin bir şekilde yüksek olduğu ve 13-93B3 ve 45S5 arasında anlamlı fark olmadığı belirtilmiştir. Skafold bulunmayan negatif kontrol grubu fibröz doku ile doldurulduğunda kusurun

kenarlarında sadece az miktarda yeni kemik oluşumu görülmüştür. Bu veriler bor bazlı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların kemik hücrelerinin büyümesi ve farklılaşması için iyi bir ortam sağladığını göstermektedir [73].

2.4. Grafen

2.4.1. Grafenin Yapısı ve Özellikleri

Grafen, karbon atomlarının tek bir düzlemde bal peteği örgüsü oluşturacak şekilde bir araya gelmiş 2 boyutlu (2D) halidir. Bu haliyle grafen, grafit temelli bütün malzemelerin yapı taşı görevindedir. Grafen; döndürülüp küre şeklinde bağlanırsa fulleren, silindir şeklinde kıvrılırsa nanotüp veya üst üste katmanlar şeklinde bir araya getirilirse grafit oluşturabilir (Şekil 2.4.). İki boyutlu grafit üzerinde teorik çalışmalar 70 yıldır gerçekleştirilmektedir. İlk çalışmalardan yaklaşık 40 yıl sonra grafenin, yoğun maddenin sahip olduğu (2+1)-boyutlu kuantum elektrodinamik özelliğe sahip olduğu anlaşılmış ve bu durum grafeni teorik çalışmalar için mükemmel bir çalışma malzemesi haline getirmiştir. Grafen, fulleren, grafit, karbon nanotüp gibi 3 boyutlu yapıların ayrılmaz bir yapı taşı görevini görse de sadece akademik çalışmalarda kullanılan bir malzeme olduğu ve doğada serbest bir halde bulunamayacağı düşünülmekteydi [74]. Yıllar boyunca sadece kâğıt üzerinde çalışılan bu akademik malzeme ve bunun üzerinden yapılan modellemeler 2004 senesinde Novoselov ve Geim tarafından kurşun kalem ve selobant kullanılarak bir anda gerçeğe dönüştürülmüştür ve serbest durumda bulunabilen grafen keşfi gerçekleştirilmiştir [75, 76]. Bu keşfi takip eden çalışmalarda grafenin kütleli Dirac fermiyonları [77], anormal kuantum hall etkisi [78] ve oda sıcaklığında balistik taşınma [79] gibi özelliklerinin keşfedilmesiyle bir anda grafen pratik çalışmalar için de akademik çevrenin yeni gözdesi haline gelmiştir.



Şekil 2.4. Grafen ve grafen temelli malzemelerin yapısını gösteren şematik. (a) grafen, (b) fulleren, (c) karbon nanotüp, (d) grafit [74].

İki boyutlu (2D) kristallerin termodinamik bakımdan kararsız olduğu ve kesinlikle mevcut olamayacağı çok uzun bir süre önce Landau ve Peierls tarafından savunulmuştur [74]. Savundukları teoride, düşük boyutlu kristal kafeslerde termal dalgalanmaların atomların yer değiştirmelerine yol açacağını ve herhangi bir sıcaklıktaki atomlar arası uzaklıklarla kıyaslanabileceğini göstermiştir [80]. Bu teori daha sonrasında Mermin [81] tarafından genişletilip deneysel olarak desteklenmiştir. Teoride bahsedilen ve sonradan deneysel olarak kanıtlanan çalışmalar göstermiştir ki; ince filmlerde kalınlık düşürüldükçe ergime sıcaklığı hızla düşmekte ve çok katmanlı kalınlıklarda olmasına karşın malzeme kararsız konuma gelmektedir [82]. Bu yüzden tek tabakalı malzemeler sadece diğer üç boyutlu malzemelerin yapı taşı olarak görülmüştür ve böyle bir 3 boyutlu üst yapı olmaksızın iki boyutlu yapıların var olamayacağı düşünülmüştür. Bu durum 2004 senesinde tek katmanlı bor nitrür, yarı katmanlı BSCCO (Bizmut stronsiyum kalsiyum bakır oksit) ve grafen gibi malzemelerin keşfedilmesiyle değişmiştir [76].

Tek katmanlı bir atom düzlemi iki boyutlu yapıyı oluştururken üç boyutlu bir ince film için 100 katmanın bir araya gelmesi gerekmektedir. Grafenin elektronik yapısının katman sayısı ile hızla değiştiği ve katman sayısının 10'a ulaşmasıyla 3

boyutlu malzemenin özelliklerine yaklaştığı belirtilmiştir [83]. Elektronik yapıları incelendiğinde malzemenin 3 ve daha fazla (<10) katman sayısında oldukça komplike bir hal aldığı belirtilmiş bu sebeple de grafeni tek katmanlı, çift katmanlı ve çok katmanlı (3-10 arası) olarak sınıflandırılmıştır [74, 75, 83, 84].

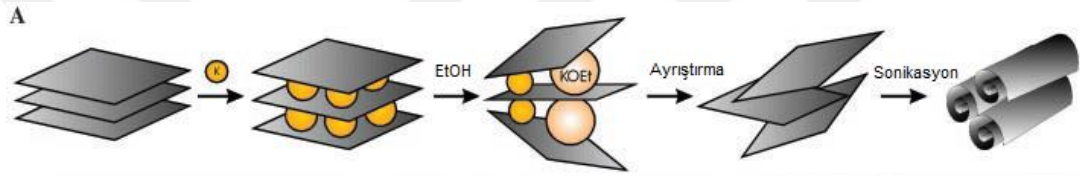
Grafen bilim dünyasının yıldızı olmaya başladığından beri sahip olduğu özellikleri açığa çıkarmak için pek çok çalışma yapılmıştır. Şimdiye kadar grafenin rapor edilen bazı nitelikleri, yüksek kırılma mukavemeti (125 GPa) [85], Young modülü (~1100 GPa) [85], elektron yüklerinin yüksek hızlarda taşınması ($200,000 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) [86], termal iletkenlik ($\sim 5,000 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$) [87] ve spesifik yüzey alanıdır (hesaplanan değer, $2,630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) [88].

B. Lang ve ark [89]. tekli kristal Pt alt tabakalarında karbonun termal olarak ayrışmasıyla tek ve çok katmanlı grafit oluşumunu göstermiştir. Bu çalışma tek katmanlı grafitin sentezinin ilk denemesi olarak gösterilebilir. Bununla birlikte, Pt'nin farklı kristal düzlemlerinde oluşan bu tabakaların özellikleri arasındaki tutarsızlık ve ürünün yararlı uygulamalarını tanımlama başarısızlığı nedeniyle, süreç o zaman geniş bir şekilde incelenememiştir. Uzun bir aralıktan sonra, 1999'da yine grafen üretmek için az sayıda girişimlerde bulunulmuştur [74]. Ardından, Novoselov ve ark. 2004 yılında grafenin eksfoliyasyon yoluyla tekrarlanabilir sentezini gösterdiler ve bu sayede grafenin kâşifleri unvanını kazandılar. O zamandan beri grafenin büyük ölçekli ve verimli bir şekilde sentezlenmesi için yeni işleme yolları geliştirilmeye çalışılmaktadır. Grafenin sentez yolları, aşağıda tasvir edildiği gibi geniş bir şekilde farklı kesitlere ayrılabilir.

Grafenin üretiminde kuru ayrıştırma [75], sıvı faz ayrıştırması [90], SiC'de büyüme [91], metal üzerine çökeltmeyle büyüme, kimyasal buhar biriktirme (CVD) [92], moleküler ışın epitaksisi, atomik katman epitaksisi, kimyasal sentez ve amorf karbon ve diğer karbon kaynaklarından ısı yönetimiyle dönüştürme gibi çok çeşitli yöntemler mevcuttur [90].

Grafit, van der Waals kuvvetiyle birlikte birbirine bağlanmış birçok grafen tabakasının bir araya gelmiş halidir. Böylece, prensip olarak, yüksek saflıkta bir grafit levhadan, eğer bu bağlar kırılabilirse, grafen üretmek mümkündür. Eksfoliyasyon ve bölünme yönteminde, bu zayıf bağları kırmak ve grafen levhalarını

ayırmak için mekanik veya kimyasal enerji kullanılır. Bu yöndeki ilk girişim, Viculis ve diğerleri tarafından [93] potasyum metalinin saf grafit tabakalarının arasına sokulup karbon tabakalarının ayrıştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrışan nano-karbon levhalar sonikasyon işlemi yapılmasıyla nano tomar haline almıştır. TEM analizi sonucunda, her tabakada 40 ± 15 katman olduğu görülmüştür. Bu karbon nano tomarlar, çok katmanlı grafenden çok daha kalın olmasına rağmen, yapılan çalışma grafen katmanlarının grafitten ayrılabilceğini uygulamalı olarak göstermesinden dolayı önemli bir çalışma olmuştur. Bu işlem sonunda çok katmanlı grafen üretmek için modifikasyona ihtiyaç duyulmuştur. Novoselov ve diğerlerinin ayrıştırma yöntemiyle çok katmanlı grafen hatta tek katmanlı grafenin üretimi başarmalarına kadar bir çözüm yolu bulmak yaklaşık 20 ay sürmüştür.

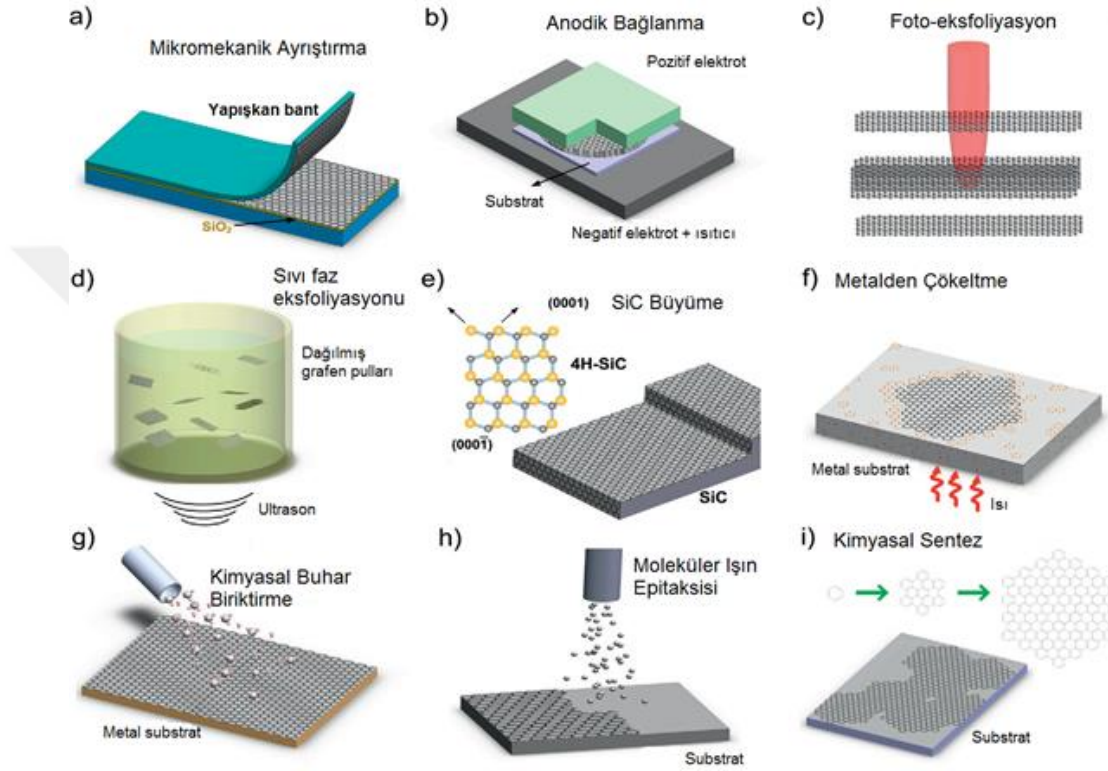


Şekil 2.5. Fiziksel ayrıştırma; potasyum kullanılarak birbirlerinden ayrılan grafit tabakalarını gösteren şematik [93].

Kimyasal buhar biriktirme metodu yeni sayılabilecek metotlardan biridir. Bu yöntemle düzlemsel çok katmanlı grafen (PFLG) sentezi ilk olarak Somani ve ark. tarafından 2006 senesinde gerçekleştirilmiştir [94]. Bu çalışmada, Ni folyolarında grafen sentezlemek için doğal, çevre dostu ve düşük maliyetli kâfur kullanılmıştır. Kâfur ilk olarak 180 °C'de buharlaştırılmış daha sonra CVD fırınının başka bir odasında 700 ila 850 °C'de pirolize edilmiş ve taşıyıcı gaz olarak argon kullanılmıştır. Oda sıcaklığına doğal olarak soğutulduktan sonra Ni folyolarında birkaç katmanlı grafen levhalar gözlemlenmiştir. Üretilen grafenin, birden fazla kıvrımı bulunduğu ve grafen levhalarından oluşan yaklaşık 35 katmanlı bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, grafen sentezi için yeni bir işlem yolu açmıştır ancak bu yöntemde kat sayısını kontrol etmek, katlanmaları en aza indirmek gibi birçok sorunu mevcuttur [95].

Grafen oksit in grafene indirgenmesi bilinen bir diğer grafen üretim metodudur. Grafen oksit ilk olarak 19. Yüzyılda hazırlanmıştır ve o günden beri

üretiminde temel olarak Staudenmaier [96], Brodie [97] ve Hummers [98] metotları olmak üzere 3 farklı yol izlenmektedir. Her üç yöntemde de grafit güçlü oksidantlar ve asitlerle oksidasyona uğrattılır. Gerçekleştirilen oksitlenmenin seviyesi yöntem, reaksiyon koşulları ve kullanılan grafitte göre farklılık gösterebilmektedir. Grafen oksitin kimyasal yapısını ortaya çıkaran geniş çaplı araştırmalar yapılmış olsa da literatürde halen bazı modeller tartışılmaktadır [99].



Şekil 2.6. Grafenin üretim yöntemlerini gösteren şematik [90].

Grafenin sahip olduğu mükemmel elektronik, termal, optik ve mekanik özellikler [75, 87, 100–102] sayesinde pek çok alanda inovasyonun parçası olmuştur. Bu alanlardan biri de medikal uygulamalardır.

2.4.2. Grafenin Biyomedikal Uygulamaları

Eşsiz yapısı ve geometrisi sayesinde grafen, yüksek kırılma mukavemeti, mükemmel elektriksel ve termal iletkenlik, yük taşıyıcıların hızlı hareketi, geniş spesifik yüzey alanı ve biyouyumluluk gibi göze çarpan fiziksel-kimyasal özelliklere sahiptir. Bu özellikler grafeni, kanser tedavisi, medikal görüntüleme, doku mühendisliği, biyosensör, DNA/RNA ekstraksiyonu, bakteriyel inhibisyon, antiviral malzemeler vb. gibi geniş bir uygulama yelpazesi içerisinde ideal bir malzeme

olmasını sağlamıştır. Nano-tıp alanında, grafen temelli malzemeler, biyomedikal uygulamaların geliştirilmesi için yeni fırsatlar sağlayan biyomalzemeler hazırlanmasına olanak sağlamıştır. Bunlardan biri de seçici ilaç taşınımı işlemi için yeni nesil nano-taşıyıcılar üretilmesidir. Bu gelişmenin kanser tedavilerinde kemoterapinin neden olduğu bazı dezavantajların aşılmasına olanak sağlayabileceği öngörülmektedir [103].

Biyomoleküller, hastalık gelişimini de içeren tüm yaşam süreçlerinde vazgeçilmez rol oynamaktadır ve bu nedenle biyomoleküllerin doğru algılanması hastalık teşhisi ve tedavisi için kritik önem taşımaktadır. Grafen esaslı malzemeler, optik ve elektrokimyasal sinyal vermeyi de içeren farklı algılama mekanizmalarına dayalı çeşitli biyosensörler oluşturmak için kullanılmaktadır. Yüksek duyarlılığı, düşük maliyeti, hızlı yanıtı ve kolay işlenmesi nedeniyle, elektrokimyasal yaklaşım, biyomolekül tespiti için en iyi yöntemlerden biri olarak düşünülmektedir. Mükemmel elektrokimyasal özellikleri, grafeni biyomoleküllerin tespitini geliştirmek için umut verici bir elektrot malzemesi haline getirmektedir [104].

Biyolojik işlemlerde ve klinik analizlerde önemli bir arabulucu olarak hidrojen peroksitin (H_2O_2) hızlı tanımlanması ve tespiti büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, H_2O_2 'nin saptanması diğer elektro-aktif maddeler tarafından kolaylıkla engellenebilmektedir. Elektrokimyasal H_2O_2 sensörlerinin geliştirilmesinde kilit nokta, oksidasyon/indirgeme potansiyellerini azaltmaktır [105]. Zhou ve ark. [106], tarafından yapılan çalışmada grafit ve katkısız elektrotlara kıyasla grafen katkılı elektrotlar, elektron transfer hızında belirgin bir artış göstermiştir. Çalışmada H_2O_2 'nin elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. H_2O_2 'yi saptamada grafen temelli elektrotların bu şekilde önemli bir performans göstermesinin son derece hassas elektrokimyasal sensörlerin üretilmesini sağlayabileceği belirtilmiştir. Shao ve ark. [107] yaptıkları çalışmada H_2O_2 'nin indirgenmesinde azot katkılı grafenin (N-grafen), grafenden daha iyi elektrokatalitik etkinlik sergilediğini belirtmişlerdir.

Grafen'in diğer nanomalzemeler üzerindeki en büyük avantajı, çok atomlu katman tabakasının her iki tarafına da çok miktarda ilaç molekülü yüklemeye olanak sağlayan ve grafeni etkili bir ilaç taşıyıcısı haline getiren yüksek yüzey alanı ($2630 m^2/g$) ve sp^2 hibridize karbon olmasıdır. Örneğin, Dai ve çalışma grubu [108, 109],

π -istifleme yoluyla basit fiziksel adsorpsiyon kullanarak, anti kanser ilaçları olan SN38 ve doksorubisini (DOX) nanographene oksit (NGO) üzerine yüklemişlerdir. Seçici olarak kanser hücrelerini hedeflemek için, CD20+ (kansere hücrelerinde fazlaca bulunan aktifleştirilmiş glikosile edilmiş bir fosfor proteini) antijen, polietilen glikolün bağlanması yoluyla NGO'ya eklenmiştir. Tasarlanan ilaç salınım sisteminin pH'ya bağlı olduğu kanıtlanmıştır çünkü DOX'in hidrofiliğinin ve çözünürlüğünün asidik ortamda arttığı gözlemlenmiştir. Zhang ve ark. [110] fonksiyonel GO tarafından karışık antikanser ilaçlarının hedefe gönderilmesi üzerindeki çalışmaları genişletmişlerdir. İki çeşit antikanser ilacı olan DOX ve Camptothecin (CPT) π - π istifleme ve hidrofobik etkileşimler vasıtasıyla kontrol edilerek folik asitle (FA) birleştirilmiş NGO (FA-NGO) üzerine eklenmiş ve özel olarak MCF-7 hücrelerine nakledilmişlerdir. Sonuçlar, iki antikanser ilacı ile yüklü FA-NGO'nun, tek bir ilaçla yüklü NGO'ya kıyasla hedef hücrelere karşı belirgin derecede yüksek sitotoksisite gösterdiğini ortaya koymuştur [110].

Fototerapi, kemoterapi ve gen terapisinin yanı sıra, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilir başka bir terapötik yaklaşımdır. Fototerapi (PTT) ve fotodinamik terapi (PDT) dahil olmak üzere fototerapi, hastalığı spesifik ışık ışınlanması ile kontrol edebilmektedir. PTT, ışık ışınlanması altında ısıyı üretmek için bir optik emici madde kullanır, bu nedenle biyolojik dokular anormal hücrelerin selektif yıkımını arttırmak için artan bir sıcaklığa maruz bırakılır. Grafen, yakınlıkta yansıma bölgesindeki güçlü optik adsorpsiyonu nedeniyle PTT alanından büyük ilgi görmüştür. Zhang ve ark. [111] tek bir sistemde kemoterapi ve fototerapiyi kolaylaştırmak için hem ısı hem de ilacı tümör bölgesine verebilen DOX yüklü PEG-nanografen oksit (NGO-PEG (polietilen glikol)-DOX) geliştirmişlerdir. İn vivo sonuçlar, tasarlanan yaklaşımın tek başına kemoterapi veya fototerapi tedaviden daha üstün olduğunu göstermiştir. Yang ve ark. [112] PTT ile tümör biyolojik görüntüleme kapasitesini birleştirmek için kimyasal indirgenmiş grafen oksit (CRGO)-demir oksit nanopartikül (IONP) nanokompozit prob tasarlamışlardır. MRI rehberliğinde tümörler, RGO-IONP-PEG tedavisiyle $0,5 \text{ Wcm}^{-2}$ 'lik düşük bir güç yoğunluğunda 808 nm'lik bir NIR lazeriyle ışınlamada etkili bir şekilde ablasyona uğratılmıştır [112].

2.5. Skafold Hazırlama Yöntemleri

3 boyutlu poroz yapılı skafold hazırlanması için pek çok yöntem mevcuttur bu yöntemlerin bazılarında aşağıda bahsedilmiştir.

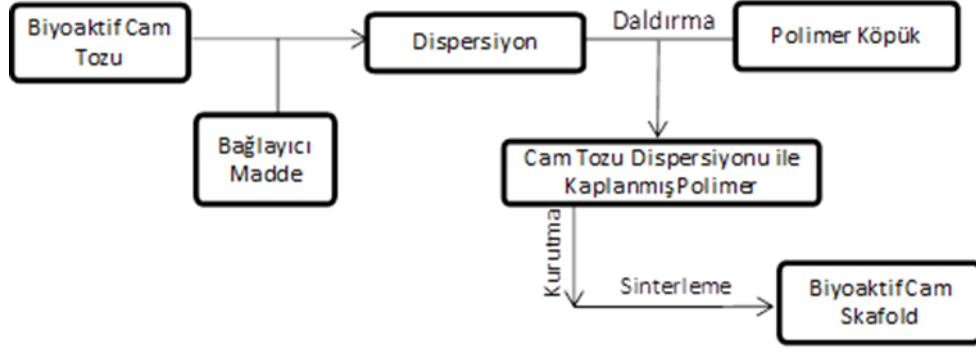
2.5.1. Sol-jel İşlemi

Sol-jel işlemi, solüsyonun hazırlanması, “sol”ün jelleşmesi (jel) ve çözücünün uzaklaştırılması ile inorganik malzemelerin kimyasal sentezi olarak tanımlanır. Sol-jel işlemi, bir sistemin sıvı "sol" fazdan katı "jel" faza geçişini içerir. İşlem metal alkoksitlerin inorganik polimerizasyon tepkimelerine dayanmaktadır [113]. Sol-jel işlemi sayesinde yüksek homojenlikte inorganik oksit malzemeler üretilmektedir. Diğer üretim yöntemleri için ihtiyaç duyulan yüksek sıcaklıklar yerine bu işlem sayesinde istenilen özelliklere (kimyasal dayanıklılık, sertlik, gözeneklilik gibi) sahip malzemeler daha düşük sıcaklıklarda üretilmektedir [114, 115].

Makro gözenekli camlar (veya cam köpükler), bir yüzey aktif madde varlığında ve “sol”ün jel haline getirmesi amacıyla eklenen asidik bir katalizör (seyreltik HF) kullanılarak “sol”ün köpürtülmesi ile hazırlanabilir [116, 117]. Bu yöntemle hiyerarşik yapı, arttırılmış reaktivite ve hücre birleşimi için mezo gözenekler (2-50 nm) ve birbirine bağlı makro gözenekler dizisi (10-500 µm) elde edilebilir [118]. Makro gözenekli camlar doku mühendisliği ve kemik dokusu onarımı ve rejenerasyonu uygulamaları için önemli özelliklere sahiptir. Bu malzemelerin kemik rejenerasyonunda kullanımı üzerine hem *in vitro* hem de *in vivo* testler olumlu sonuçlar vermişlerdir [119].

2.5.2. Polimer Köpük Replikasyonu

Polimer köpük replikasyonu tekniği ilk olarak 1963'te seramik köpüklerin imalatı için geliştirilmiş bir prosestir. Proseste biyoaktif cam skafoldların imalatı için uygulama Şekil 2.7.'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Polimer köpük replikasyonu proses şeması [113].

Polimer replikasyon işleminde, başlangıç yapısı, bir polimer (ör. Poliüretan) köpüğe ya da süngere, biyoaktif cam partikülleri içeren dispersiyon kaplanması ile hazırlanmaktadır. Zaten istenen makro yapıya sahip olan polimer köpük, biyoaktif cam kaplama için şablon görevi görür. Köpük, dispersiyon içine daldırılır ve dispersiyon polimer yapının içerisine girer. Cam parçacıkları polimer alt katmanının yüzeyi üzerinde homojen bir şekilde kaplanır. Sonrasında fazlalık dispersiyon köpükten mekanik yollarla uzaklaştırılır. Yapı kurutulduktan sonra gözenekli biyoaktif cam kaplamasının içerisindeki polimer, mikro yapı hasarını (yani mikro çatlak oluşumunu) en aza indirmek için düşük ısıtma hızları kullanılarak ısı uygulama ile yapıdan uzaklaştırılır. Polimer tamamen degrede olunca, cam istenilen sıcaklıkta sinterlenir [113].

Köpük replikasyon tekniğinin avantajlarından biri de kemik defektinin boyutuna ve şekline uyacak biçimde düzensiz şekiller üretilebilir olmasıdır. Ayrıca, köpük replikasyon tekniği, toksik kimyasalların kullanılmasını gerektirmez ve SFF (solid free-form fabrication), hızlı prototiplendirme gibi diğer işleme tekniklerine kıyasla düşük maliyetlidir [113].

2.5.3. Dondurarak Döküm (Freeze-Casting)

Bu şekillendirme metodu, gözenekli ve kompleks şekilli seramik veya polimerik parçalar üretmek için kullanılan basit bir üretim tekniğidir [120]. Bu metoda göre hazırlanan seramik dispersiyon bir kalıba dökülür ve burada dondurulur. Donma işlemi sonrası dispersiyonun içerisinde bulunan donmuş çözücü, kalıptan çıkarmak sırasında parçayı bir arada tutmak için geçici olarak bağlayıcı görevi görür. Ardından, parçaların içerisindeki solventin uzaklaştırılabilmesi için vakum altında

dondurularak süblimleşmeleri sağlanır. Bunun sebebi hava ortamında kuruma sırasında oluşabilecek çatlaklara ve deformasyona sebep olan gerilmelerin ve büzülmelerin önüne geçebilmektir. Kurutma işlemi sırasında dispersiyon içerisinde süblimleşerek uzaklaşan buz kristalleri daha sonradan yapıdaki gözenekleri oluşturmaktadırlar. Kurutma işleminden sonra, numuneler üretmek istenilen mukavemet, sertlik ve porozite oranına göre sinterlenir. Sonuç, dondurma sırasında üretilen karmaşık ve çoğunlukla anizotropik gözenekli mikro yapıya sahip bir skafolddur [121, 122]. Buz kristallerinin büyüme yönünü kontrol ederek nihai malzemedeki gözeneklilik için tercihli bir yönlendirme yapmak mümkündür. Dispersiyon konsantrasyonunu, donma sıcaklığını ve sinterleme sıcaklığını seçerek gözenek yapısının kontrol edilebileceği belirtilmiştir [123, 124].

Dondurarak döküm metoduyla hidroksiapatit (HA) [121, 124], alümina [123], silika [125], titanyum dioksit [126] ve biyoaktif cam [127] gibi pek çok seramik çeşidiyle gözenekli skafold üretimi gerçekleştirilmiştir.

2.5.4. Jel-Döküm

Köpüklerin jel dökümü, yüksek mekanik mukavemetli seramik skafoldların üretimi için yaygın kullanılan bir tekniktir. Ancak genellikle kötü bağlanmış gözenek yapısı ve düzgün olmayan gözenek boyutu dağılımı ile sonuçlanmaktadır [128]. Jel döküm yöntemi ilk olarak 1990'lı yıllarda Oak Ridge Ulusal Laboratuvarı'nda Omatete ve Janney tarafından geliştirilmiştir. Genel prensip, monomerlerin polimer oluşturmak için reaksiyona girmesi ve asılı parçacıkları istenen şekle göre jelleştiği bir 3 boyutlu ağ oluşturmasıdır. Jel-döküm, kısa üretim süreleri, yüksek verim ve düşük maliyetli işleme fırsatı sunarak kompleks şekil üretimine uygun birçok şekillendirme yöntemiyle ilgili problemleri ortadan kaldırmaktadır [129]. Jel-döküm işleminde seramik tozları, monomer, çapraz bağlayıcı, serbest radikal başlatıcı ve katalizör ihtiva eden sulu bir solüsyona sıvı ve döküm malzemesi oluşturması için eklenir. Hazırlanan dispersiyon, uygun şekilde tasarlanmış bir kalıba dökülür ve yerinde polimerize edilerek, dağılmış seramik toz parçacıklarının kalıp boşluğu şeklindeki hareketsizleştirilen bir polimer jeli oluşturması sağlanır. Stabil kimyası ve yoğunluğu olan jelleşmiş kısım, halen ıslak haldeyken kalıptan çıkarılır ve daha sonra ıslak jelleşmiş kısım kurutulmuş numune kontrollü koşullar altında kurutulur. Kurutulmuş numune işlenebilecek kadar dayanıklıdır [130].

2.5.5. Katı Serbest Şekillendirme (SFF)

Katı serbest şekillendirme yani SFF teknikleri, CAD sistemleri, bilgisayar tabanlı tıbbi görüntüleme modaliteleri ve diğer veri üreticilerinin oluşturduğu verileri kullanarak hızla karmaşık üç boyutlu fiziksel nesnelere üretebilen bilgisayar destekli üretim teknikleridir. SFF uygulamalarının sağladığı muazzam zaman ve maliyet tasarrufu sayesinde ürün tasarımı ve imalat sanayisinde bir dönüm noktası olarak görülmektedir. Hızlı prototipleme de denilen bu üretim yöntemlerinde ilk olarak üretilmesi istenilen parçaların CAD yazılımları vasıtasıyla üç boyutlu modelleri oluşturulur. Üç boyutlu tasarımlar, yazılımlar vasıtasıyla hazırlanabileceği gibi hazır modellerin üç boyutlu dijital veya optik tarayıcılar kullanılarak da elde edilebilir. Üretilmesi istenen parçanın tasarımı modelin sınırlarını, iç ve dış yüzeylerini içermelidir. Bu bilgisayar tasarımlarının prototipe dönüştürme noktasında farklı SFF yöntemleri vardır; SLS (Selective Laser Sintering), FDM (Fused deposition modeling), SLA (Stereolithography) [131, 132].

Bu yöntemler arasında bulunan 3 boyutlu döküm skafold üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadır. 3 boyutlu basım tekniği, toz malzemeleri işlemek için mürekkep püskürtmeli baskı ya da ekstrüzyon teknolojisi kullanılmaktadır. 3D-P'nin çok yönlülüğü ve basitliği, polimerler, metaller ve seramik gibi çok çeşitli malzemelerin işlenmesini sağlar [131].

2.6. Biyoaktif Cam-Grafen Kompozit Skafoldlar

Karbon nanotüpler (CNT), geniş bir yelpazedeki teknoloji uygulamaları için çokça talep edilen bir nanomalzemelerdir. Polimerler, metaller ve seramikler gibi pek çok malzeme gelişmiş özelliklere sahip ileri düzey kompozit malzemeler üretebilmek için karbon nanotüplerle birleştirilmiştir. Bu sayede CNT, süperkapasitör elektrotlarından biyosensörlere kadar geniş bir kullanım sahası elde etmiştir. Ayrıca doku mühendisliği uygulamaları için CNT ve hücreler arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar da gerçekleştirilmiştir [133].

Meng ve ark. [133] gözenekli 45S5 biyoaktif cam skafoldları elektroforez çökeltme (EPD) yöntemiyle 1 µm kalınlığında CNT ile kaplamıştır. Hazırlanan skafoldların mekanik dayanımı ve biyoaktivite özelliklerinin CNT katkısıyla beraber

bozulmadığı belirtilmiştir. Ayrıca yalıtkan cam skafoldların elektriksel iletkenlik kazandığı ve hücre kültürü çalışmalarının yapılabileceği belirtilmiştir [133].

Porwal ve ark. [134] biyoaktif cam ve çok duvarlı karbon nanotüpleri (MWCNT) bir araya getirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada koloidal çözelti hazırlama ve spark plasma sinterlemesiyle MWCNT-45S5 kompozitler hazırlamışlardır. Kompozitler, katkısız 45S5 skafoldlara nazaran daha yüksek elektriksel iletkenlik sağlamıştır. Ancak MG-63 osteoblast benzeri hücrelerle yapılan *in vitro* hücre testleri sonucunda MWCNT katkısının kompozitlerin yüzeyindeki hücre canlılığı ve çoğalmasının önünde bir engel teşkil ettiği belirtilmiştir [134]. CNT'ye kıyasla, grafeni öne çıkartabilecek iki avantaj mevcuttur:

Grafen genellikle CNT'de yaygın olan metalik yabancı maddeler içermez. Birçok durumda, bu tür kirlilikler CNT'nin elektrokimyası üzerinde etkindir ve biyomedikal uygulamalarda zararlı bir rol oynayabilir. İkincisi ise grafitin sıvı ile eksfoliyasyonu ile grafenin büyük ölçekli üretimi hem uygun maliyetli hem de kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. Dolayısıyla, biyomedikal uygulamalar ile ilgili olarak, grafen CNT'ye kıyasla geliştirilmiş bir alternatif sunabilir. Ayrıca sahip olduğu düz, esnek, tek atom kalınlığındaki geometrisi ile kemik doku mühendisliğinde implantlar ve destekleyici alt tabakalar için iletken yüzey kaplama malzemesi olarak kullanılabilir uygun bir malzemedir [9]. Grafen-biyoaktif cam kompozitler üzerinde literatürde bulunan bazı çalışmalar şöyledir.

2013 senesinde yayınlanan çalışmada Fabbri ve ark. [9] grafenin kemik doku mühendisliğinde kullanılan 3B Biyocam® skafolda sunabileceği muhtemel avantajları ve faydaları aydınlatmayı amaçlamışlardır. Bu bağlamda polimer köpük replikasyonu metodunu kullanarak ağırlıkça %40 45S5 Biyocam® ihtiva eden skafold yapıları hazırlamışlardır. Hazırladıkları skafoldları hibrit bir sol-jel metodu kullanarak ağırlıkça %1,5 oranında olacak şekilde grafen ile kaplamışlardır. Bu çalışma sonucunda, biyoaktif cam yüzeyinde grafenin varlığının skafoldların biyoaktivitesini olumsuz etkilemediği görülmüştür. MG63 hücreleri kullanılarak yapılan hücre kültürü testlerinde hiçbir sitotoksik etki tespit edilmemiştir [9].

Porwal ve ark. [13] tarafından 2014 senesinde yayınlanan bir çalışmada spark plazma sinterlemesi kullanılarak hazırlanan 45S5 Biyocam®-Grafen kompozitlerinde

hacimce %5 oranında elektriksel iletkenliğin katkısız biyoaktif cam skafoldlarına göre yaklaşık 9 kat arttığı ve bununla beraber biyoaktiflikte herhangi bir azalma gözlemlenmediği belirtilmiştir [13].

Shih ve ark. [135] tarafından yayınlanan 2016 tarihli çalışmada püskürtme piroliz metoduyla grafen oksit(GO)-biyoaktif cam kompozitler hazırlanmış ve GO katkısının biyoaktiviteye ve antibakteriyel özelliklere etkisi incelenmiştir. Çalışma neticesinde varılan sonuçlar, GO katkılı biyoaktif camların saf biyoaktif cama göre daha büyük spesifik yüzey alanına sahip olduğu ve daha iyi antibakteriyel aktivite gösterdiği ancak biyoaktivitenin azaldığı yönünde olmuştur [135].

Lazer sinterleme sistemiyle imal edilen nano-58S biyoaktif cam skafoldlarına yapılan grafen katkısının, skafoldların mekanik ve biyolojik özelliklerine etkisini incelemek amacıyla Gao ve ark. [12] 2014 senesinde yayınladıkları bir çalışma yapmışlardır. Basma dayanımı ve kırılma toklukları incelendiğinde optimum grafen konsantrasyonunun ağırlıkça %0,5 olduğu belirtilmiştir. Ayrıca nano-58S'nin mekanik özelliklerinin, grafen içeriğinin artmasıyla (ağırlıkça %0 – 0,5) arttığı ve daha sonra grafen içeriği ağırlıkça % 1 ya da % 1,5 iken azaldığı görülmüştür. % 0,5 grafen ilavesinin, nano-58S'nin basma dayanımını % 105, kırılma tokluğunu % 38 arttırdığı belirtilmiştir. Yapılan SBF'de bekletilme testleri ve MG-63 hücrelerle yapılan hücre kültürü testleri sonucunda grafen katkılı numunelerin biyoaktivitelerinde ve hücre tutunmalarında bir sorunla karşılaşmadığı belirtilmiştir [12].

Li ve ark. [136] tarafından 2016'da bir çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmada 45S5 biyoaktif cam ve grafen oksitin indirgenmesiyle elde edilen grafen spark plazma sinterlemesi kullanılarak skafold olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan skafoldların mekanik dayanımları ve biyolojik tepkileri test edilmiştir. Bunun sonucunda mekanik dayanımın ağırlıkça %0,5 grafen katkısında optimum değerde olduğu gözlemlenmiş ayrıca MG63 hücrelerinin skafold yüzeyinde büyüdüğü ve grafen nanotozların malzemenin sitotoksitesisi üzerinde etkisi olmadığı belirtilmiştir [136].

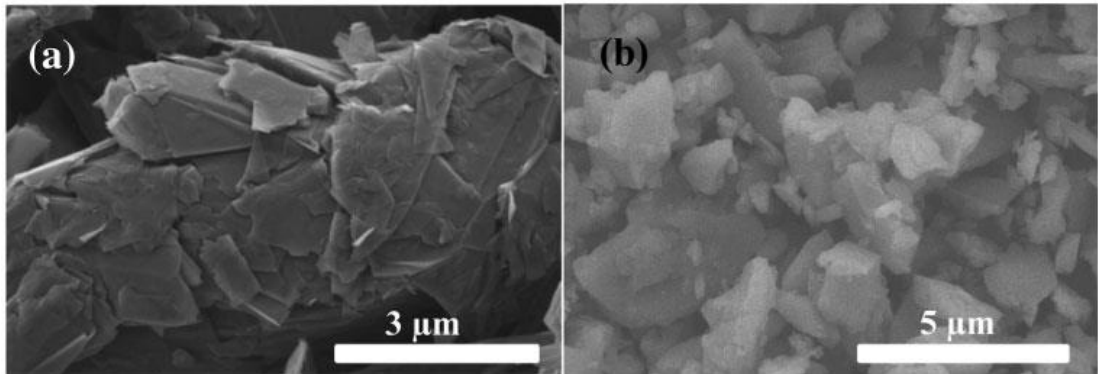
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada, daha önce ergitme yöntemiyle sentezlenmiş olan, 13-93B3 (%5,5 Na₂O, %11,1 K₂O, %4,6 MgO, %18,5 CaO, %3,7 P₂O₅, %56,6 B₂O₃) biyoaktif cam tozları kullanılmıştır. Temin edilen tozların tane boyut analizi Mastersizer 3000 cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Polimer köpük replikasyonu için hazırlanan cam süspansiyonunda çözücü olarak kullanılan susuz etanol (\geq %99,8, d:0,789 g/ml), dağıtıcı olarak kullanılan etil selüloz (%48 ethoxyl, d:1,14 g/ml), ayrıca skafoldların kaplanmasında kullanılan polikaprolakton (PCL, Mn:80000, d:1,145g/ml) ve onun çözücüsü olarak kullanılan kloroform (%99-99,4, d:1,479-1,489 g/ml) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan AO-4 sınıfı grafen nanotoz (saflık: %98,5, 60 nm plaka kalınlığı, tane boyutu 3-7 μ m) Graphene Supermarket (ABD) firmasından alınmıştır. Kullanılan grafen ve 13-93B3 biyoaktif cam tozlarının SEM görüntüleri Şekil 3.1.'de gösterilmektedir.



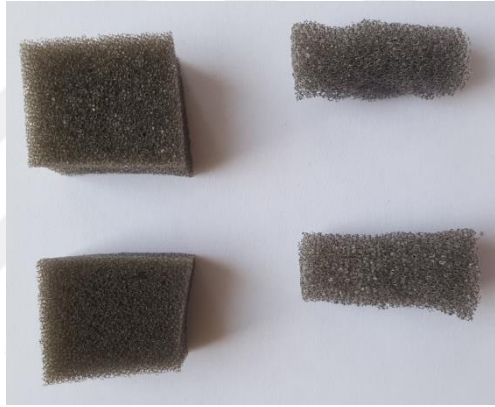
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan (a) grafen nanotozları, (b) 1393-B3 biyoaktif cam tozlarının SEM mikrografları.

Biyoaktivite testleri için hazırlanan yapay vücut sıvısında (SBF) kullanılan sodyum klorür (NaCl, MW:58,44 g/mol, \geq %99), sodyum bikarbonat (NaHCO₃, MW:84.01 g/mol, pH aralığı: 6,8-7,4), potasyum klorür (KCl, Higroskopik, MW:74,55 g/mol), potasyum fosfat dibazik(K₂HPO₄.3H₂O, \geq %99), magnezyum klorür heksahidrat(MgCl₂.6H₂O, \geq %99), kalsiyum klorür(CaCl₂, MW: 110,98 g/mol,

susuz, $\geq\%96$), sodyum sülfat(Na_2SO_4 , $\geq\%99$), Tris(hidroksimetil)aminometan ($(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$, Sigma 7-9, $\geq\%99$) ve hidroklorik asit (HCl, %36,5-38, MW: 36,46 g/mol, d:1,2 g/ml) Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır.

3.2. Skafoldların Hazırlanması

Çalışmada üç boyutlu ve açık poroziteye sahip skafold oluşturabilmek için polimer köpük replikasyonu yöntemi kullanılmıştır. Trabeküler kemik dokunun sahip olduğu poroz yapısını taklit edebilmek için benzer bir yapıda polimer köpük kullanılması gerekmektedir. Kullanılan poliüretan köpükler (60 ppi) ~15 mm kenar ölçüsüne sahip küpler ve ~10 mm çapa sahip silindirler şeklinde kesilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Polimer köpük replikasyonu işleminde kullanılan poliüretan köpüklerin dijital görüntüleri.

Skafold yapımında sırasıyla biyoaktif cam süspansiyonu hazırlama, köpüklerin bu süspansiyona batırılması ve köpüklerin ısıtılarak yapıdan uzaklaştırılması adımları izlenmiştir. Skafoldlara grafenin eklenmesi iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. İlk metotta (Metot I), grafen, cam tozları içeren dispersiyona eklenmiştir ardından gelen işlemler grafen katkılı cam solüsyonu üzerinden yapılmıştır. İkinci metotta (Metot II) ise ısıtılarak görmüş grafen içermeyen skafoldlar hazırlanmış ve bu katkisiz skafoldlar grafen nanotozları içeren PCL solüsyonuna batırılarak kaplanmışlardır.

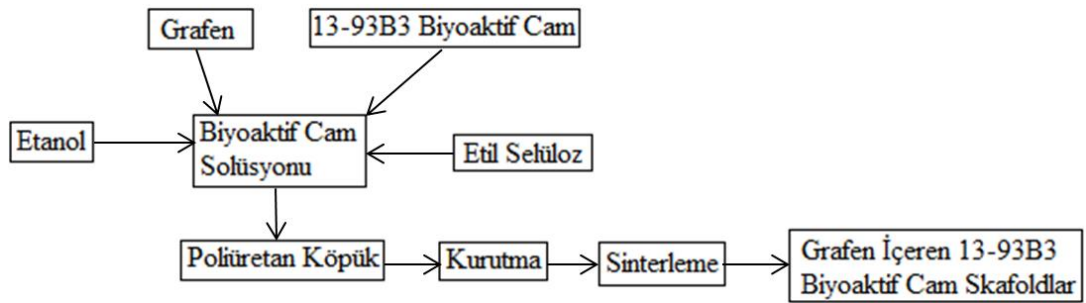
3.2.1. Grafen İçeren 13-93B3 Biyoaktif Cam Skafoldlar (Metot I)

Biyoaktif cam süspansiyonları ağırlıkça %40 cam tozu içerecek şekilde hazırlanmıştır. Karışımda dağıtıcı olarak etil selüloz, çözücü olarak da etanol kullanılmıştır. Hazırlanan dispersiyonun içeriği Tablo 3.1.'de verilmektedir.

Tablo 3.1. Polimer köpük replikasyonu yönteminde kullanılan biyoaktif cam süspansiyonunun bileşimi.

Malzeme	Miktar
Etanol	6 ml
Etil Selüloz (EC)	0,28 gram
13-93B3 Biyoaktif Cam Tozu	7 gram

Süspansiyonun hazırlanışı sırasında öncelikle 6 ml etanolün içerisine 0,28 gram etil selüloz eklenmiştir. Etil selülozun alkolün içerisinde çözünmesi zaman aldığı için bu karışım mekanik karıştırıcı yardımıyla yaklaşık 45 dakika karıştırılmıştır. Homojenizasyon sağlandıktan sonra karışımın içerisine 7 gr 1393-B3 tozu eklenmiştir. Bu aşamada cam tozunun yavaş yavaş eklenmesi karışımın akışkanlığını kaybetmemesi için önemli bir unsurdur. Camın eklenmesinden sonra solüsyon 30 dakika kadar karıştırılmıştır. Ardından solüsyon ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilmiştir. Skafold hazırlama aşamalarını gösteren şematik Şekil 3.3.'de verilmektedir.



Şekil 3.3. Grafen katkılı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların Metot-I'e göre hazırlanışını gösteren şematik.

Hazırlanan cam süspansiyonunun içerisine ağırlıkça %1, %3, %5, %10 grafen nanotozları eklenmiştir. Grafenin süspansiyon içerisinde düzgün şekilde dağılabilmesi için solüsyona 15 dakika süreyle ultrasonik çubuk yardımı ile homojenize edilmiştir. Bu uygulama sırasında süspansiyon içerisindeki etanolün uçmaması için kabın ağzı ve çubuğun etrafı parafilm yardımıyla kapatılmıştır.



Şekil 3.4. Sinterleme işlemi öncesi kurumaya bırakılan grafen içeren biyoaktif cam skafoldların dijital görüntüleri.

Verilen reçeteye göre hazırlanan süspansiyon geniş ağızlı bir kaba dökülmüş ardından köpükler tek tek süspansiyona batırılmıştır. Poliüretan köpük, süspansiyonun içerisindeyken üzerine 3 kere bastırılıp bırakılmıştır. Böylece süspansiyonun köpüğün her tarafına ulaşması sağlanmıştır. Poliüretan köpüğün süspansiyonu tamamen emmesi sağlandıktan sonra içerisindeki fazla süspansiyonun uzaklaşması için iki parmak yardımıyla, her tarafına eşit derecede olacak şekilde, kuvvet uygulanmıştır. Küp şeklindeki numunelerde karşılıklı gelen her iki yüzey için ayrı ayrı bu işlem tekrarlanmıştır, silindir numunelerde ise baskı kaldırılmadan numune iki parmak arasında yuvarlanmıştır. Bu sayede köpüklerin içerisine çektiği fazla süspansiyon uzaklaştırılmıştır. 5 farklı grafen konsantrasyonuna sahip biyoaktif cam süspansiyonu ile kaplanmış poliüretan köpükler oda koşullarında en az 48 saat olmak üzere kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan numuneler hava ortamında ısıl işleme tabi tutulmuştur. Bağlayıcıların degradasyonu ve polimer köpüğün yapıdan düzgün bir şekilde uzaklaşması için fırın 100-500 °C aralığında 1°C/dakika hızıyla ısıtılmıştır. Bu işlemin sonunda fırın sıcaklığı 5°C/dakika hızla 570 °C'ye yükseltilmiş ve örnekler 1 saat süreyle bu sıcaklıkta sinterlenmiştir. Fırınlama sırasında, tek seferde 4-5 adet numuneden fazlasının fırına konulmamasına dikkat edilmesi gerekmektedir aksi takdirde oksijen yeterli gelmediği için işlem sağlıklı gerçekleşmemektedir. Yapılan deneylerin tamamında Protherm marka PLF 120/10 model fırın kullanılmıştır. Isıl işlem sırasında kullanılan işlem basamakları Tablo 3.2.'de verilmektedir. Bu yöntem kullanılarak hazırlanan skafodlara verilen kodlar Tablo 3.3.'de verilmektedir.

Tablo 3.2. Biyoaktif cam skafodların sinterlenmesinde uygulanan fırın rejimini gösteren tablo.

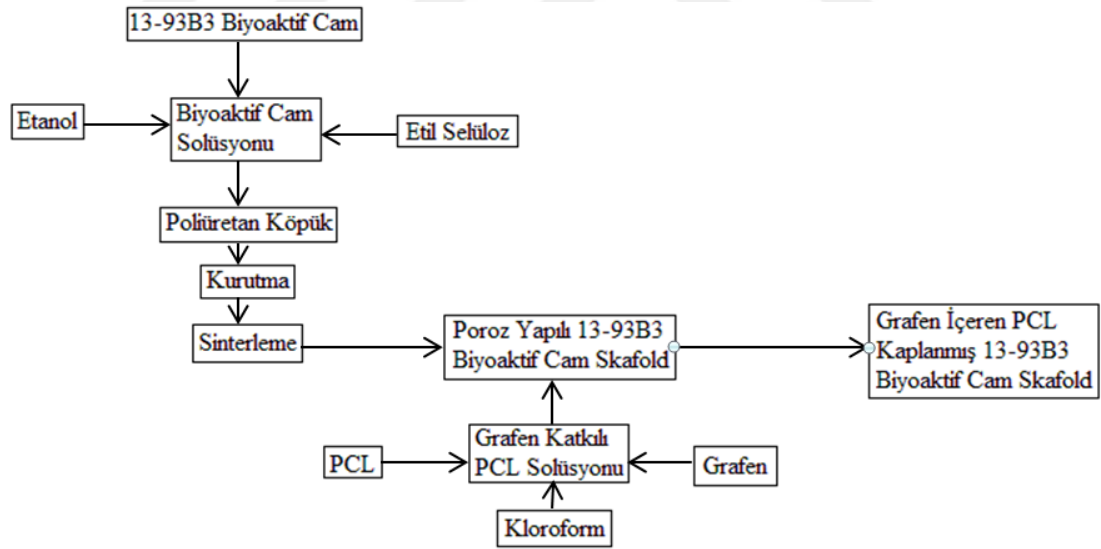
Basamak	Zaman (dk)	Sıcaklık (°C)
P1	200	200
P2	60	200
P3	50	250
P4	240	250
P5	100	350
P6	240	350
P7	50	400
P8	240	400
P9	100	500
P10	60	500
P11	12	570
P12	60	570

Tablo 3.3. Metot I kullanılarak hazırlanan skafoldların içeriğine göre kodlamalarını gösteren tablo.

Numune İçeriği	Grafen içermeyen 13-93B3 cam skafoldlar	Ağırlıkça %1 oranında grafen içeren 13-93B3 skafoldlar	Ağırlıkça %3 oranında grafen içeren 13-93B3 skafoldlar	Ağırlıkça %5 oranında grafen içeren 13-93B3 skafoldlar	Ağırlıkça %10 oranında grafen içeren 13-93B3 skafoldlar
Kodlama	Katkısız B3	%1G-B3	%3G-B3	%5G-B3	%10G-B3

3.2.2. Grafen İçeren Polikaprolakton Kaplı 13-93B3 Biyoaktif Cam Skafoldlar (Metot II)

Bu yöntemde Tablo 3.1.' de verilen malzemelerle biyoaktif cam süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan cam süspansiyonu içerisine silindir ve küp şeklindeki köpükler batırılmış ve köpüklerin süspansiyonu emmesi sağlanmıştır. Bu işlem sırasında daha önce bahsedilen prosedür aynen takip edilmiştir. Ardından numuneler ısıtma işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Grafen içeren PCL kaplanmış 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların hazırlanışını gösteren şematik.

Sinterleme sırasında Tablo 3.2.' de verilen rejim kullanılmıştır. Sinterleme sonrası silindir şeklinde hazırlanan skafoldlar 3 mm yüksekliğe sahip diskler şeklinde kesme cihazı kullanılarak kesilmiştir. Kesme işlemi sırasında bıçak 400 rpm hızında çalıştırılmış ve soğutucu olarak etanol kullanılmıştır. Hazırlanan disk şeklindeki cam

skafoldları grafenle kaplamak için polikaprolakton (PCL) kullanılmıştır. Katı PCL ağırlıkça %5 oranında olacak şekilde kloroform içerisinde çözdürülmüştür. PCL kloroform içerisinde hızlıca çözünebildiği için 30 dakikalık karıştırma işlemi yeterli gelmiştir. Hazırlanan PCL solüsyonun içerisine ağırlıkça %1, %3, %5, %10 olacak şekilde grafen nanotozları eklenmiştir. Sonrasında süspansiyon 20-30 dakika süreyle mekanik karıştırıcıda karıştırılmıştır ardından 15 dakika süreyle ultrasonik çubuk kullanılarak homojenizasyonu sağlanmıştır.



Şekil 3.6. Gözenekli cam skafoldların grafen nanotozları içeren PCL solüsyonuyla kaplanması işlemini gösteren fotoğraf.

Karışımın içerisindeki kloroformun uçmaması için işlemler sırasında kabın ağzı sürekli kapalı tutulmuştur. PCL solüsyonlarının hazırlanması sonrasında cam skafoldlar solüsyon kabının içerisinde karıştırılmıştır. 15 dakika karıştırma sonrası numuneler kabın içerisinden alınmış ve oda sıcaklığında en az 48 saat süreyle kurumaya bırakılmıştır. Bu yöntemle hazırlanan numunelere verilen kodlar Tablo 3.4.'te verilmektedir.

Tablo 3.4. Metot II yöntemiyle hazırlanan skafoldların kodlamalarını gösteren tablo.

Numune içeriği	Grafen içermeyen PCL kaplanmış 13-93B3 cam skafoldlar	Ağırlıkça %1 oranında grafen içeren PCL ile kaplanmış 13-93B3 skafoldlar	Ağırlıkça %3 oranında grafen içeren PCL ile kaplanmış 13-93B3 skafoldlar	Ağırlıkça %5 oranında grafen içeren PCL ile kaplanmış 13-93B3 skafoldlar	Ağırlıkça %10 oranında grafen içeren PCL ile kaplanmış 13-93B3 skafoldlar
Kodlama	PCL-B3	%1G-PCL-B3	%3G-PCL-B3	%5G-PCL-B3	%10G-PCL-B3

3.3. Karakterizasyonlar

Biyoaktif cam skafoldların mekanik ve elektriksel özelliklerinin ayrıca biyoaktivitesinin saptanması için çeşitli karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sahip oldukları biyoaktiflik özelliklerinin belirlenebilmesi için numuneler yapay vücut sıvısı içerisinde farklı sürelerde tutulmuştur. Yapay vücut sıvısı içerisinde yapılan bu *in vitro* deneyler numunelerin kemik oluşturma kabiliyetlerinin zamana ve grafen katkısına göre değişimini gözlemlemek için gerçekleştirilmiştir. *In vitro* deneyler sonucunda numunelerde gerçekleşen tepkimelerin ve değişimlerin saptanması için FTIR, XRD ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Numunelerin grafen katkısıyla değişen mekanik ve elektriksel özellikleri yapılan basma dayanımı ve direnç testleriyle saptanmıştır.

3.3.1. Morfolojik Karakterizasyonlar

Hazırlanan kompozit skafoldların yapılarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi amacıyla numunelere porozite ölçümü yapılmıştır. Ayrıca numuneler, por yapılarındaki değişiminin gözlenmesi amacıyla optik mikroskop altında incelenmiştir. Analizde Nikon Eclipse LV 100 model optik mikroskop kullanılmıştır. Her numune 4 farklı büyütme seviyesinde (X10, X20, X30, X50) altında incelenmiştir.

Numunelerin poroziteleri Arşimet prensibine göre hesaplanan su emme testi yöntemiyle belirlenmiştir (Bu yöntemde, biyoaktif camın tepkimeye girmemesi için su yerine etanol kullanılmıştır). Öncelikle etanol dolu kap tartılmıştır ve değer not edilmiştir ardından etanolün içerisine numune konularak 30 saniye beklenmiştir ve ağırlık not edilmiştir. Numune spatül yardımıyla etanolün içerisinden çıkarılarak etanolün ağırlığı not edilmiştir. Bu işlemler her numune çeşidi için üçer kere tekrar edilerek ortalama bir değer elde edilmiştir. Elde edilen değerler formül 3.1.'te yerine konulmuştur.

$$\text{Porozite(\%)} = \frac{(W_2 - W_3 - W_s)/\rho_c}{W_1 - W_3/\rho_c + W_s/\rho_s} \quad (3.1.)$$

W_s : Numunenin kuru ağırlığı

W_1 : Etanolla doldurulmuş kabın ağırlığı

W₂: Etanol ve numune bulunan kabın ağırlığı

W₃: İçerisinden numune çıkarılmış kabın ağırlığı

ρ_e: Etanolün yoğunluğu

ρ_s: Numunenin yoğunluğu

3.3.2. Elektriksel İletkenlik Testleri

Grafen katkısının numunelerin iletkenlikleri üzerindeki etkisini incelemek için direnç ölçüm testi yapılmıştır. Ölçümler Dokuz Eylül Üniversitesi, Elektronik Malzemeler Üretim ve Uygulama Merkezinde (UMAM) bulunan Keithley 2636B SourceMeter cihazıyla yapılmıştır. Ölçümler oda koşullarında ve değerlerin elektromanyetik alan etkisinden korunabilmesi için Faraday kafesinin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ölçüm için cihazda bulunan iki prob numunenin iki yanına değdirilmiş ve voltaj ayarı yapılarak ölçüm sonuçları alınmıştır. Problar numuneye temas ettirildikten sonra en az 60 ölçüm alınmıştır. Bu süreç problar numunenin karşılıklı gelen üç farklı noktasına değdirilerek tekrarlanmıştır. Denklemden gerekli olan kalınlık değeri bu belirtilen 3 noktanın kalınlıklarının ortalaması olarak alınmıştır. Bu direnç değeri alınarak bir sonuç elde edilmiştir. Voltaj değeri sonuçlar üzerine etkisini inceleyebilmek için bütün işlemler 0,1 mV, 1 mV ve 10 mV voltaj değeriyle tekrar edilmiştir. Ölçülen sonuçlar denklem 3.2. 'de yerine konularak öz direnç değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan öz direnç değeri denklem 3.3. 'de yerine konularak iletkenlik değeri elde edilmiştir.

$$\text{Özdirenç} = \rho = R \times \frac{(t \times r)}{l} \quad (3.2.)$$

$$\text{Özdirenç} = \Omega \text{cm}$$

$$R = \text{Direnç değeri } (\Omega)$$

$$t = \text{Numune kalınlığı (cm)}$$

$$r = \text{Probların çapı (cm)} = 0,0016 \text{ inch} = 0,0041 \text{ cm}$$

$$l = \text{Problar arasındaki mesafe (cm)} = 0,065 \text{ inch} = 0,1656 \text{ cm}$$

Hesaplanan direnç değerleri aşağıdaki denklemle iletkenlik değerine çevrilir.

$$\text{İletkenlik} = 1 / \Omega \text{cm}, \quad \text{İletkenlik} = \sigma = \frac{1}{\rho} \quad (3.3.)$$

3.3.3. Basma Dayanımı

Basma testi uygulamasıyla amaçlanan grafen katkısının numunelerin mekanik dayanımları üzerindeki etkisini incelemektir. Yapılan basma testleri Shimadzu marka AGS-X model cihazla gerçekleştirilmiştir. Basma testinin sağlıklı uygulanabilmesi için numunelerin baskı uygulanacak yüzeylerinin düz ve paralel şekilde olması gerekmektedir. Bu sebeple test öncesi bütün numunelerin yüzeyleri 800'lük zımpara yardımıyla düzeltilmiştir. Test sırasında hareketli başın hızı 0,5 mm/dk olarak belirlenmiştir. Basma testlerinde, testin hangi noktaya kadar devam edeceğini belirlemek için sabit bir deplasman değeri belirlenmektedir ancak bu çalışmada kullanılan numunelerin seramik olması ve gevrek davranış göstermeleri sebebiyle, test, numuneler kırılana kadar devam ettirilmiştir. Her gruptan en az üçer adet numune olacak şekilde testler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar bu üç değerin ortalaması ve standart sapması hesaplanarak elde edilmiştir.

3.3.4. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizleri

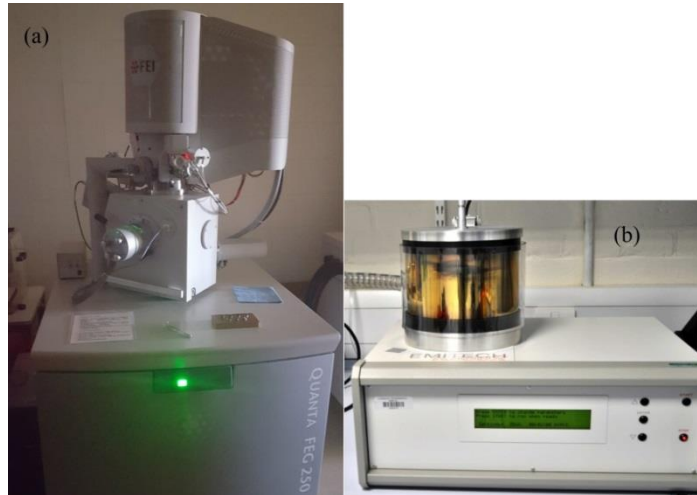
Cihazın çalışma prensibi temel olarak, gönderilen kızılötesi ışının incelenen numunede bulunan kimyasal bağlar tarafından spesifik dalga boylarında soğurulmasına dayanmaktadır. Bu analizde kendisine bağlı ATR modülü de barındıran FTIR-ATR, Agilent Cary 660 Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi kullanılmıştır. Analizde kullanılan kızılötesi (IR) değerleri Orta-IR olarak bilinen 400-4000 cm⁻¹ aralığındadır. Bu spektrum içerisinde belirlenen absorpsiyon değerleri literatürde bulunan değerlerle karşılaştırılarak numunelerde oluşmuş olan gruplar tespit edilmiştir. HA dönüşümünün göstergesi olarak kabul edilen P-O bağlarının varlığı ve zamana göre değişimi bu sayede belirlenmiştir. Bu analizlerin yapılma amacı SBF içerisinde bekletilen 13-93B3 skafoldların yüzeylerinde oluşabilecek HA tabakaların belirlenmesi ve bu sayede biyoaktivitenin grafen konsantrasyonuna bağlı olarak nasıl bir değişim gösterdiğinin saptanmasıdır.

3.3.5. X Işını Kırınımı (XRD) Analizleri

XRD analizi, numunelerin üzerine X-ışınının gönderilmesi ve atomik bağlar tarafından kırınıma uğrayan ışınların cihaz tarafından tekrar toplanması esasına dayanmaktadır. Kristal fazların sahip oldukları atomik dizilimler, gönderilen X-ışınlarının karakteristik bir şekilde kırılmasına sebep olmaktadır. Her bir bağın X-ışınına farklı bir şekilde kırması sayesinde her türlü fazın kendine özgü bir kırınım profili vardır ve bu profiller fazın tanımlanmasında kullanılır. Hazırlanan kompozitlerdeki kristal faz oluşumunu incelemek için Philips X'Pert Pro model X-ışını kırınımı cihazıyla analiz yapılmıştır. XRD, 10° - 90° 2θ açısı aralığında 0.01° /dakika tarama hızında Cu $K\alpha$ radyasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümün yapılabilmesi için kompozitler agat havanda dövülerek toz haline getirilmiştir.

3.3.6. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analizleri

Üretilen biyoaktif cam skafoldların mikroyapısı, 5 kV'luk bir hızlanma voltajında ve 10 mm'lik bir çalışma mesafesinde, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezinde bulunan taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Philips XL-30S FEG) kullanılarak incelenmiştir. Kaliteli görüntü alınabilmesi için numunelere Emitech K550X cihazı kullanılarak mıknatıssal saçırma (magnetron sputtering) metoduyla ~ 10 - 15 nm kalınlığında altın kaplama yapılmıştır.



Şekil 3.7. Projede kapsamında kullanılan; (a) SEM cihazı (Quanta FEG 250), (b) numune kaplamada kullanılan Emitech K550X cihazı.

3.3.7. *In Vitro* Degredasyon ve Mineralizasyon Deneyleri

Biyoaktif camlarda biyoaktivitenin göstergesi olan yüzeyde hidroksiapatit (HA) tabakanın oluşma sürecini gözlemlemek ve katkı miktarına bağlı olarak HA dönüşüm hızını belirlemek için *in vitro* ortamda yapay vücut sıvısı kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde kullanılan yapay vücut sıvısı (SBF) Kokubo vd. [137] tarafından geliştirilen metoda göre hazırlanmıştır. SBF, insan kan plazmasının iyon konsantrasyonu bakımından taklit edilmiş halidir (Bkz. Tablo 4.1.). SBF'in hazırlanış aşamaları aşağıdaki gibidir.

1. Geniş tabanlı bir kabın içerisine su doldurulmuştur ve bu kabın içerisindeki su 37 °C'de tutularak sabit sıcaklıklı bir su banyosu elde edilmiştir.
2. 500 ml ultra saf su barındıran beher, su banyosunun içerisine konulmuş ve üzeri saat camıyla örtülmüştür. Bundan sonraki işlemlere 37 °C'deki su banyosunun içerisinde devam edilmiştir.
3. Su banyosu manyetik karıştırıcının üstüne konulmuş ve beherin içerisine balık eklenmiştir.
4. Beherin içerisine Tablo 4.2.' de bahsedilen malzemeler sırayla ve tek tek eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
5. Son malzeme eklendikten ve çözündüğü gözlemlendikten sonra solüsyonun pH değeri ölçülmüştür ve pH değeri 7,4'e gelene kadar solüsyonun içerisine 1N-HCl eklenmiştir.
6. Hazırlanan solüsyon 1 litrelik balon jolenin içerisine konularak ultra saf suyla 1 litreye tamamlanmıştır ve bir süre daha oda sıcaklığında karıştırılmıştır.
7. Solüsyon, polietilen veya polistiren bir kabın içerisinde buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.5. Kan plazması ve yapay vücut sıvısının iyon konsantrasyonlarını gösteren tablo [138].

	Konsantrasyon (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Kan Plazması	142	5	2,5	1,5	27	103	1	0,5
SBF	142	5	2,5	1,5	4,2	148,5	1	0,5

Tablo 3.6. Çalışmada kullanılan yapay vücut sıvısı (SBF) reçetesi (1 litre için).

Sıra	Malzeme	Miktar
1	NaCl	7,996 g
2	NaHCO ₃	0,350 g
3	KCl	0,224 g
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,228 g
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305 g
6	1M-HCl	40 ml
7	CaCl ₂	0,278 g
8	Na ₂ SO ₄	0,071 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057 g

In vitro çalışmalarda 5 farklı grafen konsantrasyonuna sahip numuneler 4 farklı zaman aralığında SBF içerisinde bekletilmiştir ve bu işlem sonucunda numunelerin ağırlık değişimleri, SEM analiziyle yüzeylerinde oluşan yapılar ve morfoloji değişimleri incelenmiştir. XRD ve FTIR analiziyle HA dönüşümü incelenmiştir. Ayrıca kullanılan SBF'lerde gerçekleşen pH değişimleri de ölçülmüştür.

Yapay vücut sıvısı içerisine konulacak olan 5 farklı grafen konsantrasyonuna sahip numuneler ayrı ayrı tartılmıştır. Belirlenen numuneler yapay vücut sıvısı içerisine konulmadan önce dezenfekte edilmiştir. Dezenfeksiyon için %70 etanol-distile su karışımı kullanılmıştır, bu işlemde numuneler üçer defa etanolde bekletilmiştir. Dezenfeksiyon işlemi sonunda numuneler 24 saat hava ortamında kurumaya bırakılmıştır. Dezenfekte edilen numuneler 50 ml'lik santrifüj tüplerinin içerisine konulmuştur ve üzerlerine, 1 gram numune için 500 ml SBF oranına uygun şekilde, SBF eklenmiştir. Biyoaktif camın ve grafen katkısının yapay vücut sıvısı içerisindeki tepkilerinin incelenmesi amacıyla numuneler 7, 15, 21 ve 30 gün sürelerle 37 °C'de bekletilmiştir. 37 °C ortam stabilizasyonunu sağlamak amacıyla NÜVE marka EN 400 model inkübatör kullanılmıştır. Belirtilen sürelerin sonunda tüplerin içerisinden çıkarılan numuneler saf etanolle 3 defa yıkanmıştır ve 24 saat hava ortamında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan numunelerin ağırlıkları ölçülmüş ve ağırlık kayıpları hesaplanmıştır. Deneylerin sonunda, içerisinden numuneleri

çıkartılmış SBF'lerin pH değerleri, Hanna Instruments markalı HI 2211 model pH metre kullanılarak ölçülmüştür.

In vitro degradasyon oranlarını belirlemek ve örneklerin biyoaktivitelerini tayin etmek için gerçekleştirilen SBF içerisinde bekletme işlemi her numune çeşidi için üçer defa tekrarlanmıştır. Nihai sonuç belirlenirken bu üç numunenin sonuçlarının ortalaması alınmıştır.

3.3.8. *In Vitro* Hücre Kültürü Testleri

Hücre kültürü deneyleri C57BL/6 fare calvaria'sından (kafa kubbesi) elde edilen osteoblastik MC3T3-E1 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEFAM) Hücre Kültürü Laboratuvarlarında yapılmıştır. Sigma-Aldrich firmasından satın alınan hücreler -80°C'de saklanmıştır. Hücreler 37 °C'de hazırlanan su banyosuna daldırılarak hızlıca çözünmeleri sağlanmıştır. Çözüldükten sonra hücreler kültür kaplarını konulmuş ve besi ortamları eklenmiştir. Hücre kültürü işlemleri UV ışıkla sterilize edilebilen laminar hava akımlı kabinde (NuAire, USA) gerçekleştirilmiştir. MC3T3-E1 hücreleri, MEM α besiyerine, 10.000 ünite/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin ve %10 fetal sığır serumu (FBS; GIBCO, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY) (25ml) eklenerek 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem ihtiva eden inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücre hatları canlılık, çoğalma ve enfeksiyon durumları için inverted mikroskopta her gün incelenmiştir.

Hücre kültürü deneyleri yapmak için ilk olarak hücrelerin çoğalması için konulan kültür kaplarından ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreleri başka ortama aktarmak için 4ml tripsin/EDTA (%0,05) kullanılmıştır. Tripsin, hücrelerin yapışmasını sağlayan proteinlerini aktifliğini bozarak hücrelerin yapıştığı yerden ayrılmasını sağlamaktadır. 4ml Tripsin/EDTA hücrelerin bulunduğu kaplara eklendikten sonra 10 dk inkübatörde bekletilmiştir. Yapıştıkları yerden ayrılan hücreler daha sonra santrifüj işlemi uygulanarak hücreler çöktürülmüştür. Dibe çöken hücreler alınarak hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için tripan mavisini 1:1 oranında kullanılarak hücreler boyanmıştır. Canlı hücreler boya moleküllerini hücre zarlarından içeri almadığından beyaz olarak gözükmektedir. Ama boya molekülleri ölü hücrelerin zarlarından geçebildiğinden ölü hücreler mavi olarak gözükmektedir. Boya hücre kültürüne karıştırıldıktan sonra solüsyon alınarak lam ile lamel arasına

konulmuştur ve otomatik hücre sayımı cihazına (Cellometer, Nexcelom, ABD) yerleştirilmiştir. Bu şekilde canlı hücreler tespit edilip buna göre hücre yoğunluğu mililitredeki canlı hücre sayısı olarak hesaplanmıştır. Daha sonra skafold üzerine her 100 µl'de 5×10^4 tane hücre olacak kadar hücre süspansiyonu kültür kaplarına ekilmiştir. Hücre ekimi yapıldıktan sonra hücrelerin skafolda yapışmasına olanak vermek için 4 saat inkübe edilmektedir. Daha sonra bu şekilde 3, 7 ve 14 günlük kültür testleri uygulanmıştır. Hücre kültürleri sonunda ilk olarak hücre kültür kaplarının inverted mikroskopla faz görüntüleri alınmıştır. Daha sonra skafoldları %10 formalin bulunan bir eppendorf tüp içerisine konularak skafoldların üzerine yapışan hücrelerin fiksasyonu yapılmıştır. Bu skafoldları daha sonra üzerinde büyüyen hücreleri gözlemlemek amacıyla SEM analizi yapılmıştır. Skafolda tutunamayan hücreler ise hücre kültürü plakasına tutunarak skafoldun bulunduğu ortamda yaşamına devam etmektedir. Bundan dolayı skaffoldla inkübe edilen hücrelerin canlılığı ve farklılaşması incelemek için faz kontrastı görüntüsü, floresans boyama, 2,3-bis-(2-methyx-4-nitro-5-sulfophenyl)-2h-tetrazolim-5-carboxonilide (XTT) hücre canlılığı testi ve hücrelerde alkalın fosfataz aktivite testi (ALP) gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücre kültürü kabında kalan hücrelerin bir kısmı XTT testi, bir kısmı ALP testi ve bir kısmı da floresans görüntüleri alınmak için bölünmüştür.

3.3.8.1. XTT Analizi

Hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerin belirlenmesi için bir takım canlılık parametrelerinin ölçülmesi gerekmektedir. Başlangıç olarak hücrelerin canlılık testlerinin yapılması ve yaşayıp yaşamadıklarının belirlenmesi gerekir. Canlılık hücre zararının tepkisi test edilerek belirlenir. Tripan mavisini vb. bir boya kullanılır ve hücre zarından bu boyayı dışarı atması beklenir. Zar bütünlüğü bozulmamış canlı olan hücreler bu işlemi gerçekleştirirken zar bütünlüğü bozulmuş hücreler boyayı içeri alır. Daha sonra otomatik hücre sayım cihazıyla canlılık oranı hesaplanır [139].

Hücresinin yaşayabilirlik performansını tanımlamaya yarayan ise vitality parametresidir. Bu işlemde MTT, XTT, WST-1 gibi tetrazolyum tuzlarına hücrelerin verdiği tepki incelenir. Tetrazolyum tuzları canlı hücrelerde mitokondriyal enzimler vasıtasıyla renkli formazan boyasına çevrilirler. Renk değişiminin spektrofotometrede ölçümü yapılır. Ölü hücrelerde ise canlılarınkinin aksine

tetrazolyum tuzlarını formazan boyasına çeviremez [140]. MTT ve XTT en çok kullanılan metabolik aktivite ölçümlerinden ikisidir [140].

Çalışmada, hücre kültürü sonrasında hücre kültüründen alınan hücrelere XTT testi için hücre canlılık kiti 2 (Roche) kullanılmıştır. Üreticinin belirttiği şekilde XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2h-tetrazolim-5-carboxonilide) solüsyonu hazırlanmıştır ve hazırlanan solüsyon test için ayrılan hücrelerin üzerine toplam hücre solüsyonunun yarısı miktarınca dökülmüştür. Daha sonra bu şekilde 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda 4 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında XTT tetrazolyum tuzu canlı hücreler tarafından suda çözülebilen formazon tuzuna çevrilmiştir. Bu tuz ise suda çözünebilen parlak turuncu rengindedir. Turuncu rengin parlaklığı arttıkça hücrel olarak metabolik aktivitenin arttığı anlamına gelmektedir. 4 saat inkübasyon sonunda her hücre kültürü zaman dilimi için kendi aralarında karşılaştırarak çok modlu okuyucu ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Çok modlu okuyucu kullanılarak 450 nm - 490nm arasındaki bir referans aralığında absorbans görüntülenmiştir. Bütün zaman periyodları kendi içinde kontrol hücrelerinin absorbans değerlerine göre karşılaştırılarak yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır.

3.3.8.2. ALP (Alkalin Fosfataz Aktivitesi) Analizi

Alkalin fosfataz aktivitesi (ALP), osteojenik aktivitenin en önemli göstergelerinden birisidir. Bu amaçla katkının ön-osteoblast hücreler olan MC3T3-E1 hücrelerinin farklılaşmasına etkisini belirlemek amacıyla hücre kültürü sonrasında ALP aktivite testi yapılmıştır. ALP testi Alkalin Fosfataz Belirleme Kiti, Floresans (Sigma Aldrich, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Üreticinin belirttiği şekilde bir substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra ALP testi için ayrılan hücreler farklı bir hücre kültürü kabına yerleştirilmiştir. Her hücre kültürü kabına 20 µl hücre süspansiyonu konulmuştur. Hücreler bu şekilde 65°C'de 15-30 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuşlardır. Bu aşamada ilk olarak hücreler 2 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında bırakılmıştır. Soğuyan hücre kültürlerine tamponlar eklenmiştir. Her bir hücre kuyusuna 20µl seyreltme tamponu ve 160 µl floresans test tamponu eklenmiştir. Bu aşamadan sonra her kuyucuğa 1µl 10mM'lık substrat çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra florometre ile 360 nm uyarım ve 440 nm emisyonu ayarlanarak okuma gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi zamanla arttığından dolayı 3 zaman diliminde okumalar gerçekleştirilmiştir. İlk okuma

gerçekleştirildikten sonra 30 dk aralıkla 2 kez daha okuma yapılmıştır. ALP aktivitesi florometre cihazında her bir kuyucuğun floresans şiddeti ölçülerek gösterilmektedir ve floresans şiddeti ile ALP aktivitesi doğru orantılıdır. ALP ölçüm birimi ise Relative Luminescence Units (RLU)'dır. RLU birimi floresans şiddeti ve ALP aktivitesi ile doğru orantılıdır. Sonuçlar grafik halinde gösterilmiştir.

3.3.8.3. Floresans Boyama

Floresans boyama çoğalma testi canlı/ölü hücre boyama kiti (Sigma Aldrich, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Floresans boyama testi, üreticinin belirttiği şekilde yapılmıştır. Bu kit Calcein-AM ve Propidyum İyodür (PI) solüsyonlarını içermektedir. Bu solüsyonlar canlı ve ölü hücreleri işaretlemektedir. Burada Calcein-AM kendiliğinden floresans bir molekül değildir. Ama Calcein-AM canlı hücreler ile etkileşime girerek üretilen Calcein, güçlü yeşil bir floresans ışık yaymaktadır. Bu yüzden Calcein-AM sadece canlı hücreleri boyamaktadır. PI ise bir çekirdek boyasıdır ve canlı hücrelerin zarından içerisine geçememektedir. Ama ölü hücrelerin zarından geçerek DNA ile etkileşime girerek kırmızı bir floresans ışık yaymaktadır. Bu şekilde canlı hücreler floresans mikroskopunda yeşil olarak gözükmemektedir ve ölü hücreler ise kırmızı olarak gözükmemektedirler [141]. Deney sırasında ilk olarak üreticinin belirttiği şekilde solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra floresans testi için ayrılan hücreler birkaç kez fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra PBS ile hücre yoğunluğu ml'de 10^5 ile 10^6 arasında olacak şekilde bir solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra 100 µl hazırlanan solüsyon hücrelerin üzerine dökülmüştür. Bu işlemden sonra hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında floresans mikroskobu kullanılarak canlı ve ölü hücreleri görmek için 490 nm uyarma ile floresans görüntülemesi yapılmıştır.

3.3.8.4. Hücre Morfolojisi

3, 7 ve 14 günlük inkübasyondan sonra hücrelerin morfolojik karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi için skafoldlar kültür ortamından çıkarılmıştır. Hücre kültüründen ayrılan skafoldlar üç kez PBS ile durulanmış ve skafold üzerindeki hücreler % 2,5 glutaraldehit çözeltisiyle (Sigma Aldrich, ABD) sabitlenmiştir. Ardından skafoldlar PBS içerisinde +4 °C'de bir gece boyunca bekletilmiştir. Skafoldlar farklı konsantrasyonlardaki etanol-su solüsyonlarıyla (%50,

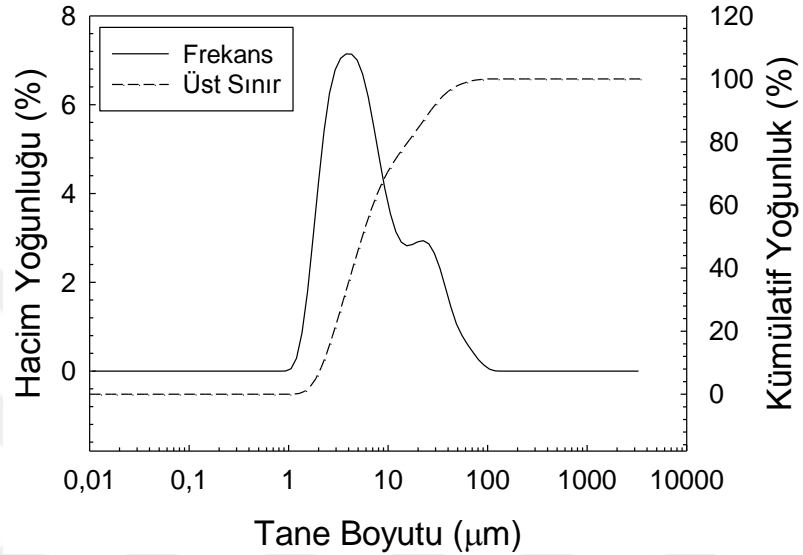
%60, %70, %80, %90 ve %100) 15'er dakika sürelerle dehidratasyon işlemine tabi tutulmuştur ve daha sonra 10 dakika boyunca hexamethyldisilazane (HMDS) solüsyonundan geçirilmiştir. Skafoldlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra altınla kaplanmış ve yüzeyleri, daha önce anlatılan koşullar altında SEM kullanılarak gözlenmiştir.

3.3.8.5. İstatistiksel Analiz

Hücre kültürü sonuçlarında elde edilen grafiklerin istatistiksel olarak değerlendirmek için GraphPad Prism programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler one-way ANOVA (Tukey's and Dunnett's Multiple Comparison Test) testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı fark $p \leq 0,05$ olarak belirlenmiştir ve bu değerin üzerindeki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Ayrıca $p \leq 0,05$ iken *, $p \leq 0,01$ iken **, $p \leq 0,001$ iken *** ve $p \leq 0,0001$ iken **** olarak gösterilmiştir ve yıldız sayısı arttıkça anlamlılık derecesi artmaktadır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Hazırlanan skafoldlarda kullanılan 13-93B3 biyoaktif cam tozunun tane boyut analizi sonucu Şekil 4.1.'de gösterilmektedir. Buna göre toz bimodel tane boyut dağılımına sahip olup ortalama tane boyutu [$d_v(50)$ değeri] 5,5 μm olarak ölçülmüştür.

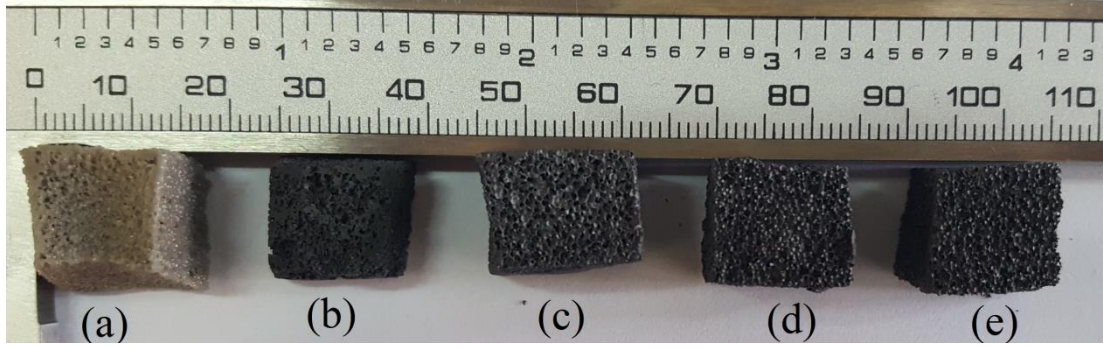


Şekil 4.1. 13-93B3 biyoaktif cam tozunun tane boyut ölçüm sonucunu gösteren grafik.

4.1. Grafen İçeren 13-93B3 Biyoaktif Cam Skafoldlar (Metot I)

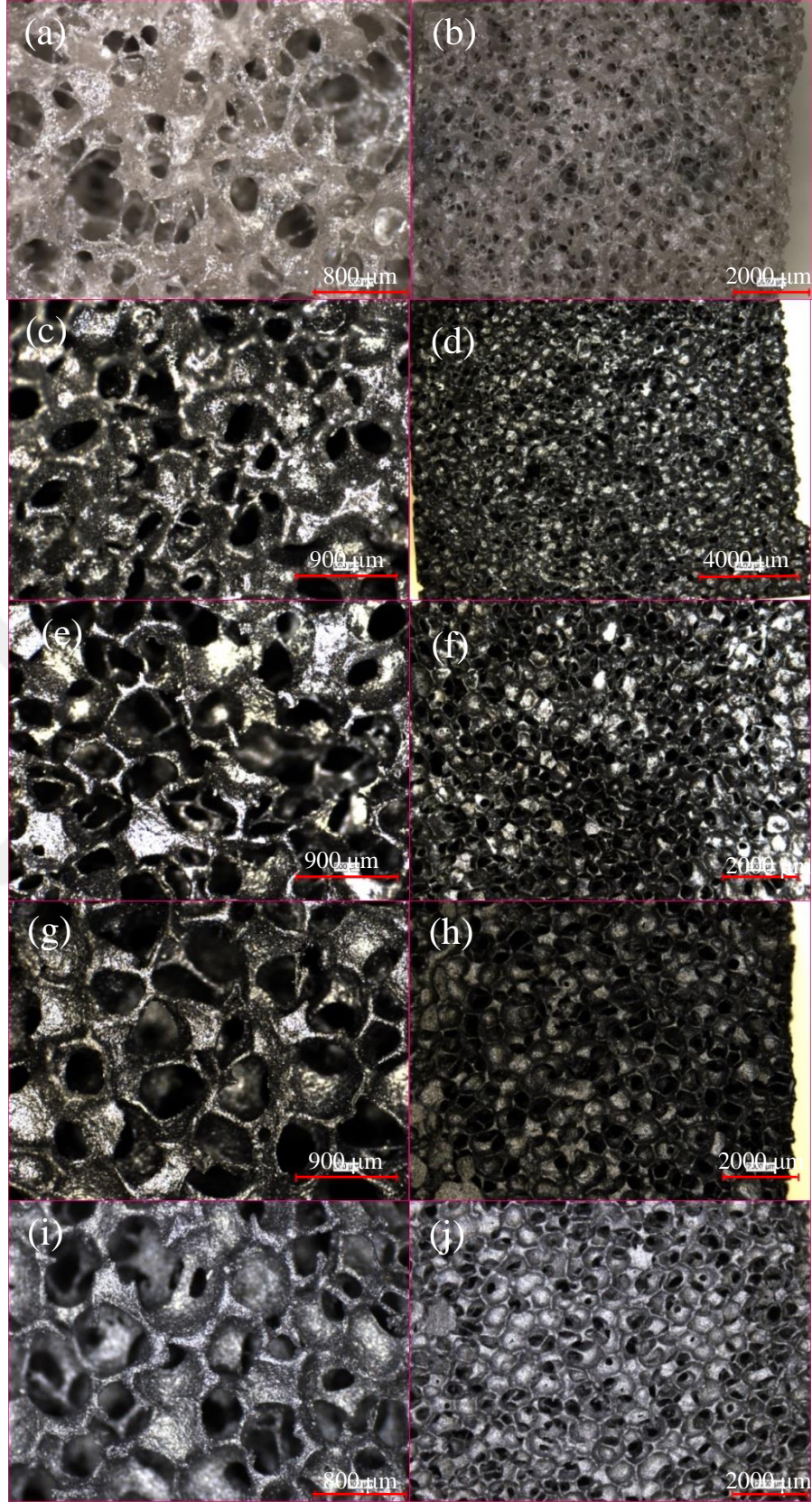
4.1.1. Morfolojik Karakterizasyonlar ve Faz Analizleri

Grafen katkılı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldlar polimer köpük replikasyonu metodu kullanılarak üretilmiştir. Şekil 4.2.'de üretimi gerçekleştirilen farklı konsantrasyonlarda grafen içeren grafen-biyoaktif cam kompozitlerin dijital görüntüleri verilmektedir.

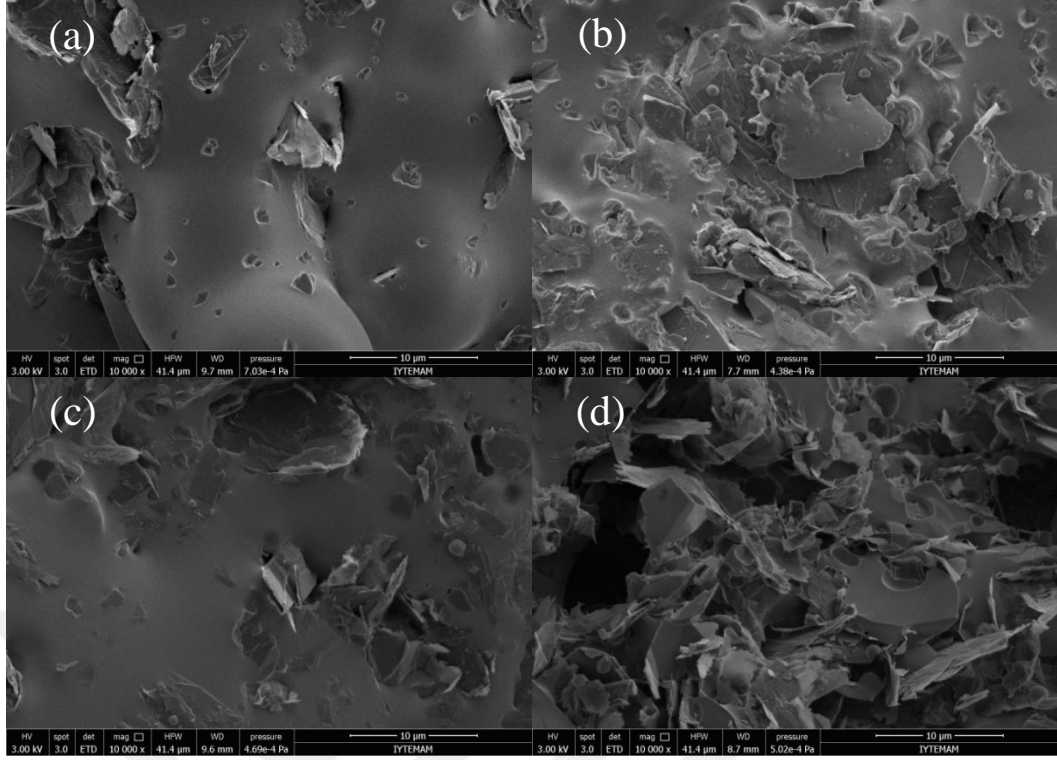


Şekil 4.2. Polimer köpük replikasyonu ile hazırlanmış grafen katkılı numunelerin sinterleme sonrası dijital görüntüleri; (a) Katkısız B3, (b) %1G-B3, (c) %3G-B3, (d) %5G-B3, (e) %10G-B3.

Bu görüntülere dayanarak, katkısız 13-93B3 ve grafen içeren bor bazlı biyoaktif cam skafoldların benzer gözenek yapılarına sahip oldukları ve morfolojik açıdan birbirlerine göre büyük farklılıklara sahip olmadıkları görülmektedir. Hazırlanan kompozit skafoldların optik mikroskop görüntüleri ve SEM mikrografları sırasıyla Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'te verilmektedir. Optik mikroskop ve SEM görüntülerinde, skafoldların camsı yapılarını koruduğu ve birbirine bağlı hücresel gözeneklere sahip oldukları görülmektedir. Gözenek boyutlarının 100-500 μm arasında değiştiği ve birbirine bağlı açık gözenek yapısının bütün numunelerde mevcut olduğu anlaşılmaktadır. Grafen nanotozların cam matrisinin içindeki varlığı SEM mikrograflarında açıkça görülmektedir.

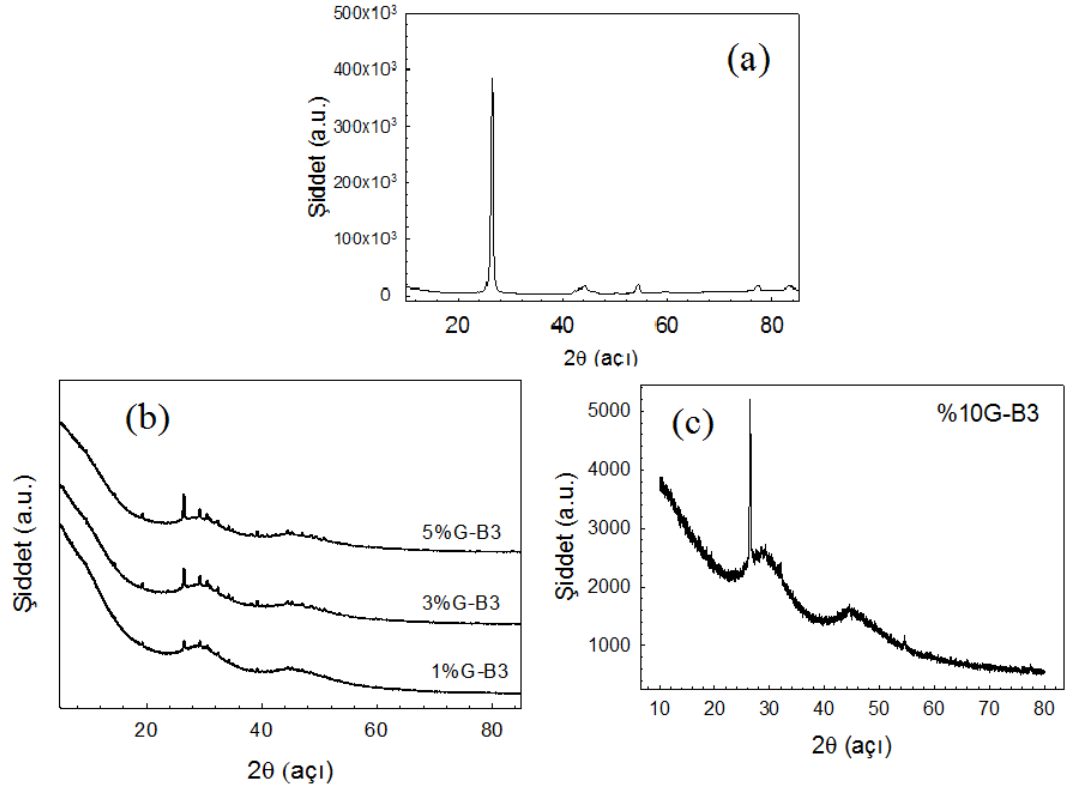


Şekil 4.3. Polimer köpük replikasyonu ile hazırlanmış grafen katkılı numunelerin optik mikroskop görüntüleri; (a)(b) Katkısız B3, (c)(d) %1G-B3, (e)(f) %3G-B3, (g)(h) %5G-B3, (i)(j) %10G-B3.



Şekil 4.4. Metot I'e göre hazırlanan numunelerin SEM görüntüleri (ölçek 10 µm); (a) %1G-B3, (b) %3G-B3, (c) %5G-B3, (d) %10G-B3.

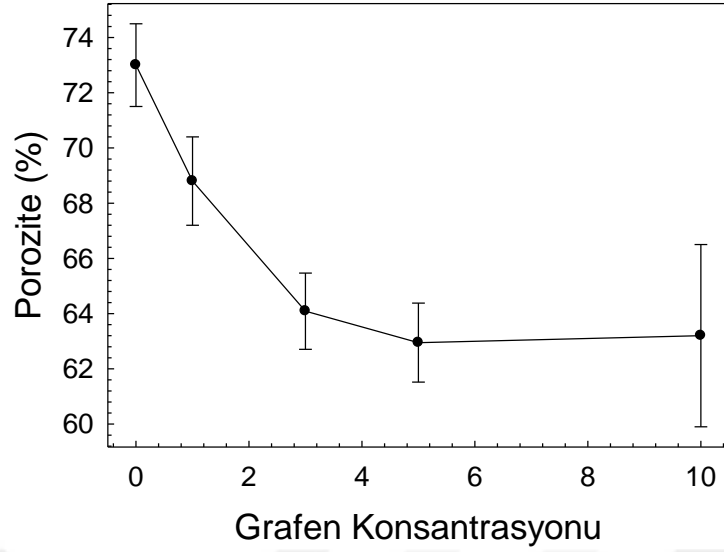
Çalışmada kullanılan grafen nanotozunun ve grafen katkısıyla hazırlanan biyoaktif cam skafoldlarının XRD sonuçları Şekil 4.5.'te gösterilmektedir. Şekil 4.5. (a)'da verilen XRD diyagramında grafenin $2\theta=26,4^\circ$ ve $2\theta=54,2^\circ$ açılarında meydana gelen karakteristik pikleri görülmektedir. Bu piklerin varlığı hazırlanan kompozit skafoldlardaki grafen mevcudiyetinin belirlenmesi açısından önemlidir.



Şekil 4.5. Grafen ve grafen katkılı kompozit biyoaktif cam skafoldların XRD diyagramları; (a) Grafen, (b) %1G-B3, %3G-B3, %5G-B3, (c) %10G-B3.

Buna göre, yapıya grafen dâhil edildiğinde, kristal 002 düzlemine ait kristal piki $2\theta=26,4^\circ$ ve 004 düzlemine ait kristal piki $2\theta=54,2$ açılarında ortaya çıkmıştır. 570 °C'de gerçekleştirilen ısıl işlem sonrası oluşabilecek grafen oksitin karakteristik piki olan 002 düzlemine karşılık gelen $2\theta=9,8^\circ$ açısındaki pikin oluşmadığı gözlemlenmiştir. Nan ve ark.'ın [142] daha önceki çalışması, grafenin termal kararlılığının, atmosfer, tabakalar arası etkileşim, kristal alan boyutu, ve iç kusurlar gibi grafenin özelliklerine bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Buna göre Şekil 4.5.'e dayanarak deneysel çalışmalarda kullanılan grafenin hava atmosferinde 570 °C'de stabil davranış gösterdiği sonucuna varmak mümkündür.

Arşimet metodu kullanılarak poroziteleri ölçülen grafen katkılı kompozit skafoldların grafen konsantrasyonuna bağlı olarak porozite oranlarındaki değişim Şekil 4.6.'da görülmektedir.

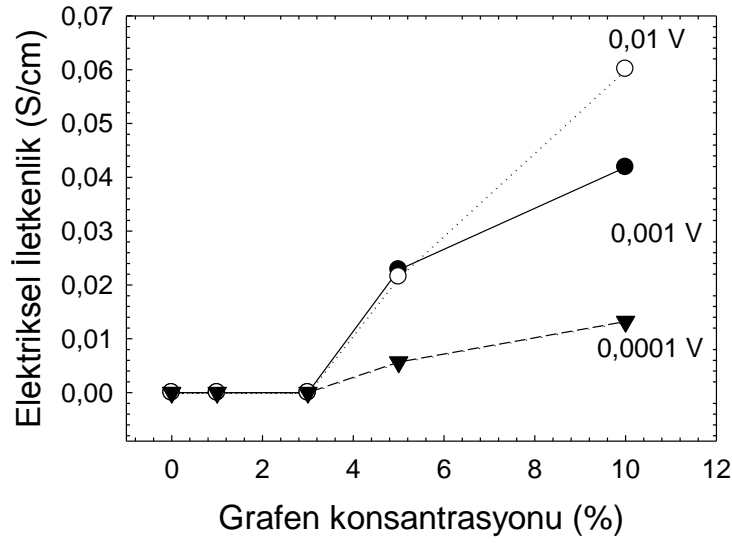


Şekil 4.6. Grafen içeren 13-93B3 kompozit skafoldların porozitelerini gösteren grafik.

Bu sonuca göre, grafen konsantrasyonu arttıkça gözeneklilikte bir düşüş meydana gelmiştir. Katkısız 13-93B3 cam skafoldların gözeneklilik oranı $73 \pm 1,5$ iken, %10G-B3 skafoldlar için gözenekliliğin $63,2 \pm 3,3$ değerine gerilediği görülmüştür. Grafen içeren numunelerin gözeneklilik değerlerinde azalma, biyoaktif cam süspansiyonlardaki grafen nanotozlarının aglomerasyonuna bağlanabilir. Bir seramik matristeki grafen dispersiyonunun kalitesinin kompozitin nihai özelliklerini önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir [8]. Grafen konsantrasyonundaki artışla birlikte süspansiyon akışkanlığındaki azalma, işlemi daha da zor hale getirir ve nihayetinde skafoldun homojenliğinde ve gözenekliliğinde azalmaya neden olabilir.

4.1.2. Elektriksel İletkenlik

Çalışmada, grafen konsantrasyonunun bor bazlı biyoaktif cam skafoldlarının elektriksel iletkenliği üzerindeki etkisi incelenmiştir. Şekil 4.7.'de grafen konsantrasyonuna bağlı olarak farklı voltaj değerlerinde ölçülen elektriksel iletkenlik değerleri gösterilmektedir. Beklenildiği gibi, kompozitlerin elektriksel iletkenliği, cam matrisinde artan grafen konsantrasyonu ile birlikte artmıştır. Ağırlıkça %5 grafen içeren skafoldlardan başlayarak kompozit biyoaktif cam skafoldlarının elektrik iletkenliğinde önemli bir artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7. Metot I'e göre hazırlanan kompozit skafoldların elektriksel iletkenlik değerlerini gösteren grafik.

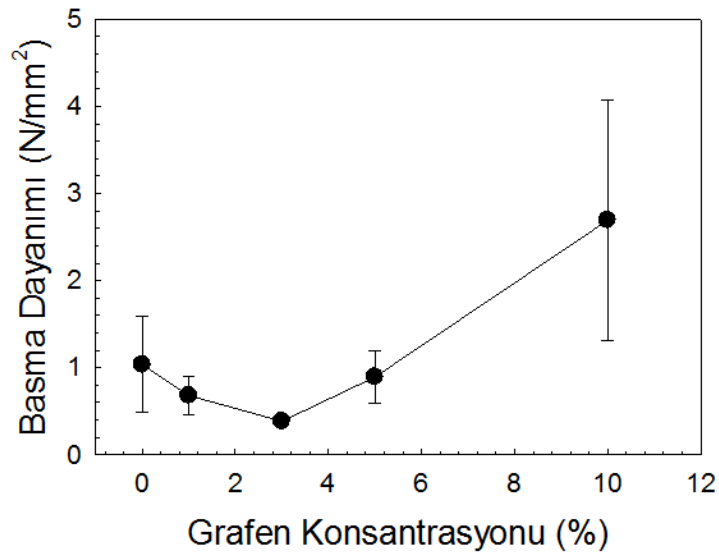
Çalışmada katkısız 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların elektriksel iletkenliği $2,31 \times 10^{-8}$ S/cm olarak ölçülmüştür. Bu matrise ağırlıkça %5 ve %10 oranında grafen ilave edilmesi durumunda (uygulanan voltaj 0,01 Volt iken) elektriksel iletkenlikte belirgin bir artış gözlemlenmiştir. %5G-B3 ve %10G-B3 biyoaktif cam skafoldların elektriksel iletkenlik değerleri sırasıyla 0,0228 ve 0,060 S/cm'ye olarak ölçülmüştür. Diğer taraftan, ağırlıkça %1 ve %3 oranında grafen içeren örneklerin elektriksel iletkenlik değerleri sırasıyla $3,2 \times 10^{-8}$ ve $1,6 \times 10^{-6}$ olarak elde edilmiştir. Porwal ve ark. [13] tarafından hazırlanan 45S5-grafen nanoplaka kompozit biyoaktif cam skafoldlarda hacimce %5 grafen ilavesiyle elektriksel iletkenliğin 0,13 S/cm olduğu ve bu değer katkısız 45S5 biyoaktif cam skafolda göre 9 kat yüksek olduğu belirtilmiştir. Diğer yandan Fan ve ark. [143] alümina matrisinin içerisine hacimce %2,35 oranında grafen eklenmesi durumunda 10 S/cm'lik bir elektriksel iletkenlik elde edildiğini bildirmişlerdir.

Bir kompozit içerisinde bulunan iletken nano parçacıkların (grafen nanotozlar gibi) miktarı kritik bir değere ulaştığında (percolation threshold, sızıntı eşiği) bu iletken nano parçacıklar tarafından sürekli bir elektrik iletkenlik ağı oluşturulur ve bu sayede kompozit yapı elektriksel olarak iletken duruma geçer [144]. Elektrik iletkenliğindeki sızıntı eşiğinin dolgu malzemesinin şekli, ebadı ve en-boy oranına

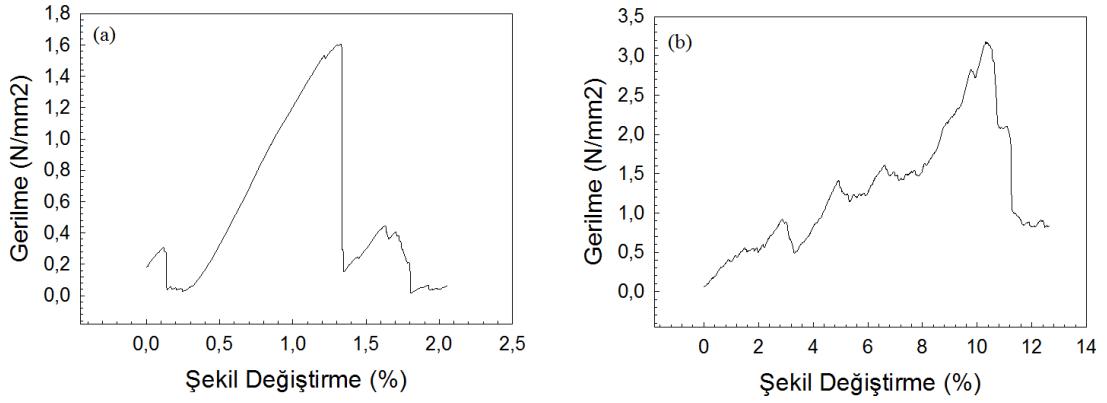
bağlı olduğu bilinmektedir [144]. Bu nedenle, aynı tür malzemelerden oluşan benzer yapı türlerinin elektrik iletkenliği dolgu maddesinin hacim fraksiyonuna ve matris içindeki aglomerasyon derecesine bağlı olarak farklılık gösterebilir. Literatürde benzer kompozit malzemelerin elektriksel iletkenlik değerlerinde gözlenen farklılıklar, bu faktörlere bağlanabilir. Elektriksel iletkenliğin ağırlıkça %5 ve %10 grafen içeren numunelerde ani artış sebebinin sızdırma eşiğine ulaşılmasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Hazırlanan kompozitlerin elektriksel iletkenliği (ağırlıkça %5 grafen konsantrasyonundan başlayarak) elektrik stimülasyonu ile hücre büyümesini teşvik etme işlemini gerçekleştirebilmek için yeterli düzeydedir.

4.1.3. Mekanik Özellikler

Hazırlanan kompozit skafoldların basma dayanımı değerleri ve katkısız B3, %10G-B3 numunelerinin gerilme-şekil değiştirme grafikleri sırasıyla Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'da verilmiştir. Skafoldların grafen konsantrasyonuna bağlı olarak basma dayanımlarında (%10G-B3 hariç) önemli bir değişim gözlemlenmemiştir. Şekil 4.9.'de yer alan grafiğe göre numuneler gevrek davranış göstermektedir. %10 grafen içeren kompozit skafoldların basma dayanımı katkısız biyoaktif cam ile karşılaştırıldığında daha yüksek değerlere sahiptir. Bunun sebebi %10G-B3 numunenin katkısız numuneye göre sahip olduğu düşük porozite oranı gösterilebilir.



Şekil 4.8. Grafen katkısının skafoldların basma dayanımına etkisini gösteren grafik.



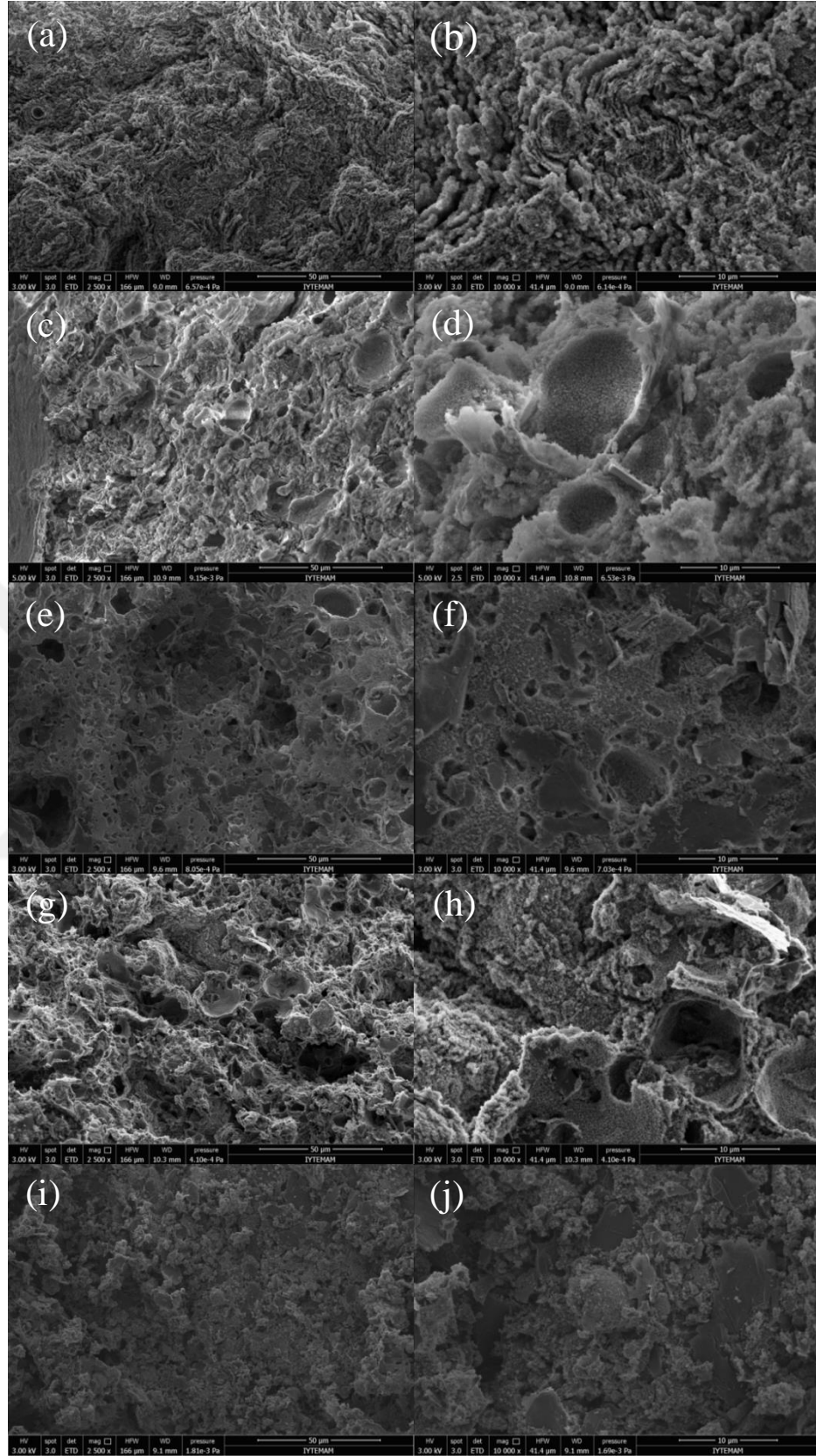
Şekil 4.9. (a) Katkısız B3, (b) %10G-B3 örneklerinin gerilme-şekil değiştirme grafikleri.

Ayrıca, % 10G-B3 kodlu skafoldlarda katkısız biyoaktif cam skafoldlara göre daha yüksek şekil değiştirme oranları ölçülmüştür. Bunun sebebi olarak cam matrisine grafen nanotozların eklenmesiyle tokluğun artması gösterilebilir. Kompozitlerde katkı maddesi ilavesiyle birlikte mekanik özelliklerde artış gözlenebileceği, özellikle de seramik matrisine grafen ilavesi ile kırılma tokluğunda iyileşme görüldüğü daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Touri ve ark. [8] ağırlıkça %0,25 MWCNT ilavesinin 45S5 biyoaktif cam skafoldların elastik modülünü arttırdığını ve bu durumun takviye faz olarak görev yapan MWCNT'lerin matrisinde dağılımı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, MWCNT oranının ağırlıkça %0,5'e artmasıyla elastik modül azalmıştır. MWCNT konsantrasyonlarının çok yüksek olmasının, taneler arası etkileşimler sebebiyle aglomeratlar oluşturduğu, bu durumun MWCNT'nin kompozit malzemelerin içinde homojen olmayan dağılım yarattığı belirtilmiştir. Matris içinde heterojen dağılım elastik modülün azalmasına ve kırılma tokluğunun artmasına neden olmaktadır [8]. Michalkova ve ark. [145] çeşitli yöntemleri kullanarak silikon nitrid matrisinde grafen nanotozların disperse edilmesiyle homojen bir şekilde dağıldığı kompozitler hazırlamışlardır. Hazırlanan bütün kompozitler, saf silikon nitrürle karşılaştırıldığında mekanik özelliklerde azalma göstermiştir. Chen ve ark. [146] sıcak preslemeyle ağırlıkça %0,1 ile %1 arasında değişen oranlarda grafen nanotozlarını alümina matrisine eklemişlerdir. Grafen/alümina kompozitinin %0,2 grafen içeren optimum konsantrasyonunda kırılma tokluğunda %43,4 artış kaydedilmiştir. Seramik matrisler için dört adet sertleştirme mekanizması mümkündür [146]: Çatlak sapması, grafen nanotozun geniş spesifik yüzey alanı sayesinde gerçekleştirilebilmektedir. Çatlak hareketinin

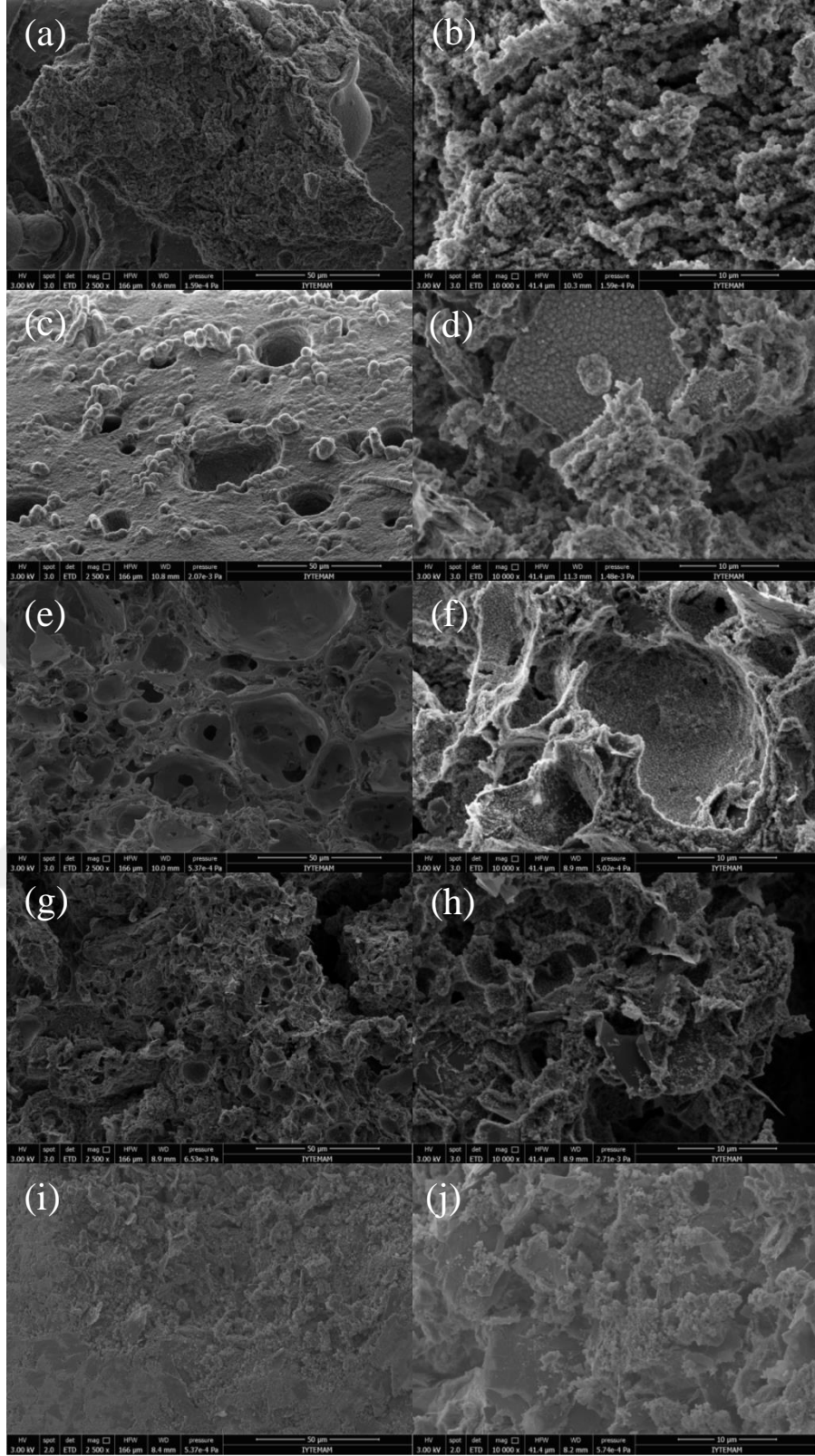
durdurulması, grafen nanotoz varlığının etkisiyle çatlak hareketi yavaşlar hatta durur. Çatlak kenetlenmesi, grafen nanotozlarının kırılma enerjisini etkili bir şekilde dışarı atmasıyla gerçekleşir. Çatlak dallanması, tokluğun artmasına katkıda bulunan birkaç mikrometre uzunluğunda çatlaklar oluşturur [146].

4.1.4. *In Vitro* Degredasyon ve Mineralizasyon Deneyleri

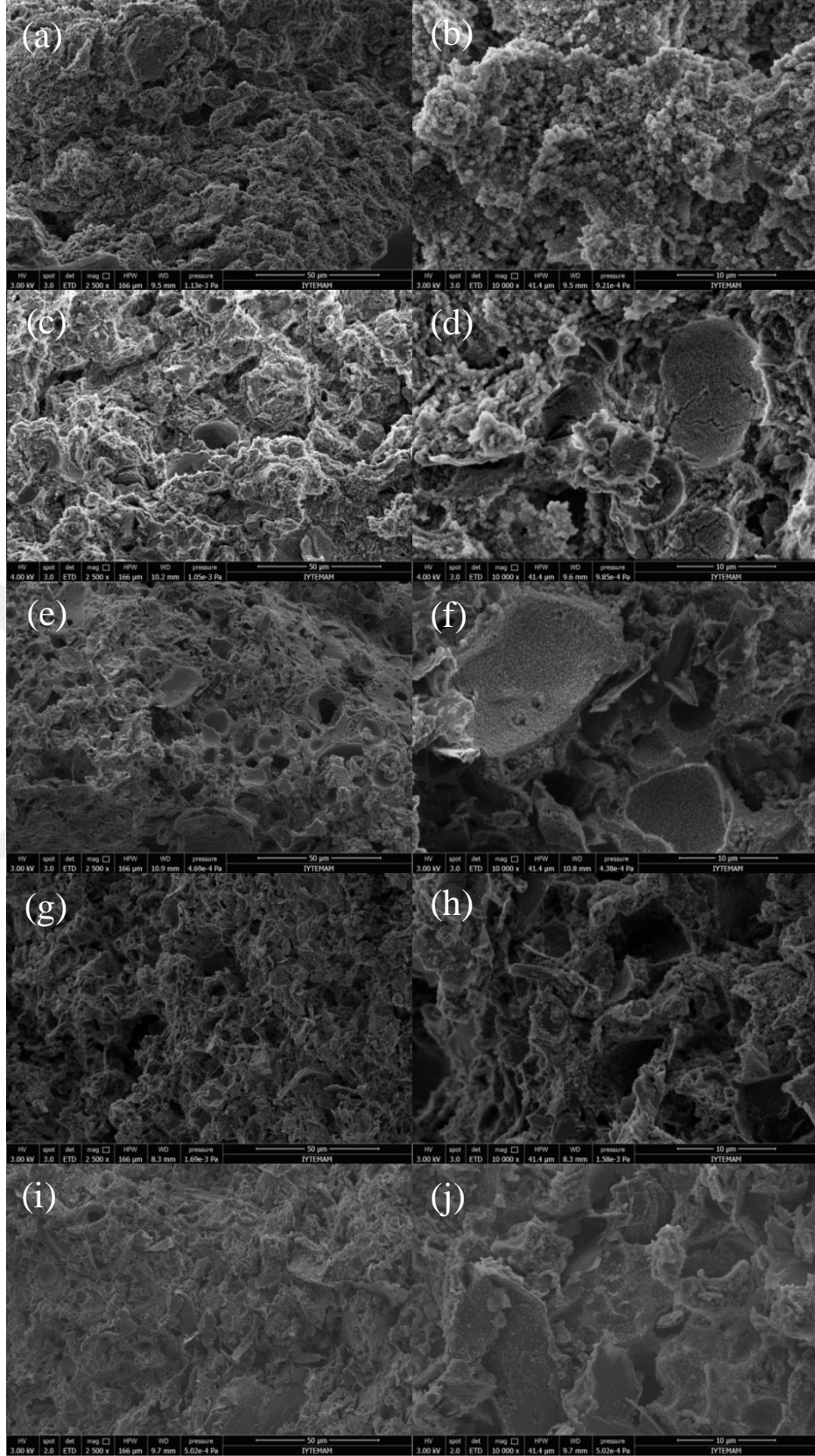
Çalışmada, hazırlanmış skafoldların HA oluşum kabiliyeti statik koşullar altında 37 ° C'de SBF'de *in vitro* olarak araştırılmıştır. Camın, fizyolojik sıvılar içerisinde HA benzeri tabaka oluşturması biyoaktivite göstergesi olarak kabul edilir. HA tabakasının oluşma hızına göre camın biyoaktivitesinin derecesi anlaşılabilir. Bu sebeple numuneler SBF gibi fizyolojik bir sıvıda bekletilmiş ve yüzeylerinde oluşan değişim incelenmiştir. Şekil 4.10., 4.11. ve 4.12.'deki SEM görüntüleri sırasıyla 7, 15 ve 30 gün boyunca SBF içerisinde bekletilen katkısız ve grafen içeren bor bazlı biyoaktif cam skafoldların yüzeylerini göstermektedir. Yapay vücut sıvısı gibi sulu bir fosfat solüsyonuna daldırıldığında, biyoaktif camlar, çevresindeki doku ile kuvvetli bağ oluşturmalarındaki sebep olan amorf bir kalsiyum fosfata veya HA benzeri bir malzemeye dönüşürler. SEM görüntülerine göre sinterlenmiş skafoldların pürüzsüz yüzeyiyle karşılaştırıldığında, SBF içerisinde tutulan skafoldların yüzeyinde ince taneli ikinci bir faz gözlemlenmiştir. Farklı oranlardaki grafen içeriğine sahip kompozitlerde yüzeyde oluşan HA tabakasının morfolojisinde gözlemlenebilir bir fark bulunmamaktadır. Bununla birlikte, oluşan HA benzeri tabakanın miktarında bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.10. SBF içerisinde 7 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek:50 µm) ve yüksek (X10000, ölçek:10 µm) büyütmelelerdeki SEM görüntüleri; (a)(b) Katkısız B3, (c)(d) %1G-B3, (e)(f) %3G-B3, (g)(h) %5G-B3, (i)(j) %10G-B3.

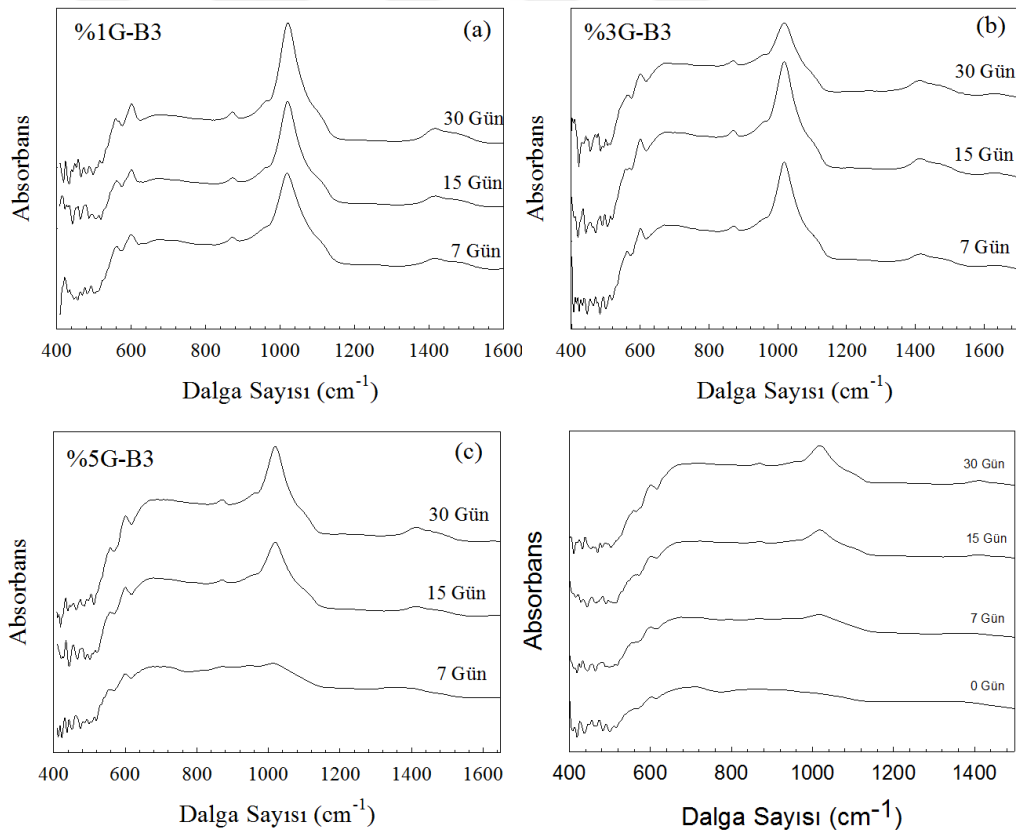


Şekil 4.11. SBF içerisinde 15 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek:50 µm) ve yüksek (X10000, ölçek:10 µm) büyütmeledeki SEM görüntüleri; (a)(b) Katkısız B3, (c)(d) %1G-B3, (e)(f) %3G-B3, (g)(h) %5G-B3, (i)(j) %10G-B3.



Şekil 4.12. SBF içerisinde 30 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek:50 µm) ve yüksek (X10000, ölçek:10 µm) büyütmelelerdeki SEM görüntüleri; (a)(b) Katkısız B3, (c)(d) %1G-B3, (e)(f) %3G-B3, (g)(h) %5G-B3, (i)(j) %10G-B3.

SBF içerisinde bekletilmiş skafoldların FTIR spektrumlarında kalsiyum fosfata karşılık gelen $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ 'de rezonans göstermiştir (Şekil 4.13.). 560 ve 604 cm^{-1} 'deki çift pikli P-O eğilme titreşim bandı kristal fazda HA oluşumunu karakterize eden temel göstergelerdir. Ayrıca $500-600\text{ cm}^{-1}$ arasında bölünmüş P-O eğilme titreşim bandı ile gösterilen bir kristalin Ca-P tabakası görülmektedir [60, 147, 148]. Kristal HA oluşumunu gösteren bu pikler 7 gün SBF içinde bekletilen %1G-B3 kodlu skafoldlarda mevcuttur. Diğer yandan Şekil 4.13.'e göre hazırlanan biyoaktif kompozit skafoldların içerisindeki grafen miktarı arttıkça oluşan kalsiyum fosfat ve kristalin HA pik şiddetlerinde düşüş gözlenmiştir. Kalsiyum fosfat fazına tekabül eden 1000 ile 1100 cm^{-1} arasında değişen rezonans yoğunluğu, kompozit skafoldlarda ağırlıkça %5 grafen konsantrasyonundan başlayarak azalmıştır. %10 grafen içeren numuneler ve daha kısa süre (7 gün) SBF'de bekletilen örnekler için gözlemlenen bu durum daha belirgindir.

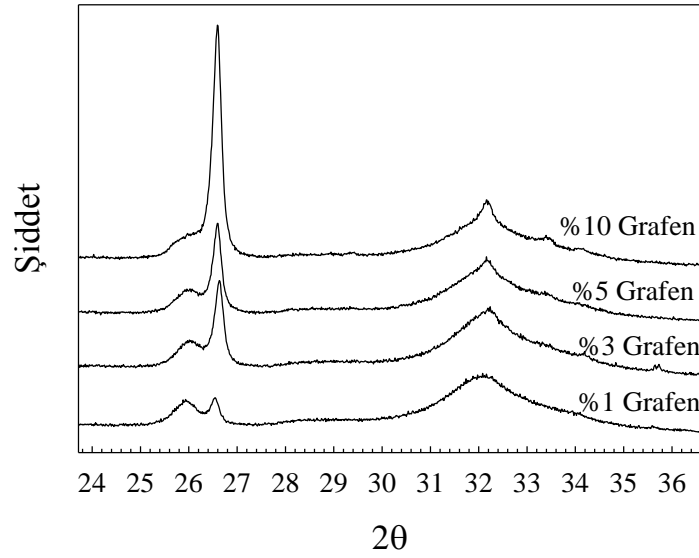


Şekil 4.13. Farklı sürelerde SBF'te bekletilen numunelerin FTIR spektrumları; (a) %1G-B3, (b) %3G-B3, (c) %5G-B3, (d) %10G-B3.

Elde edilen sonuçlara benzer şekilde, Shih ve ark. [135], hazırladıkları kompozitlerde grafen oksidin antibakteriyel etkiyi arttırdığını, ancak biyoaktif

camların biyoaktivitesini azalttığını raporlamışlardır. Öte yandan, Eçtesadi ve ark. [149], robotik döküm metodu ile hazırlanan 45S5 biyoaktif cam skafoldlara indirgenmiş grafen oksidin (hacimce %0-3) eklenmesinin, biyoaktivitesini bozmadan mekanik performansı geliştirdiğini göstermişlerdir [149]. Bu nedenle, grafen/biyoaktif cam skafoldlarının HA oluşturma yeteneğinin, cam bileşimi, grafenin yapısal özellikleri, cam fazındaki konsantrasyonu ve üretim koşulları gibi bazı faktörlere bağlı olarak değişebileceği sonucuna varmak mümkündür.

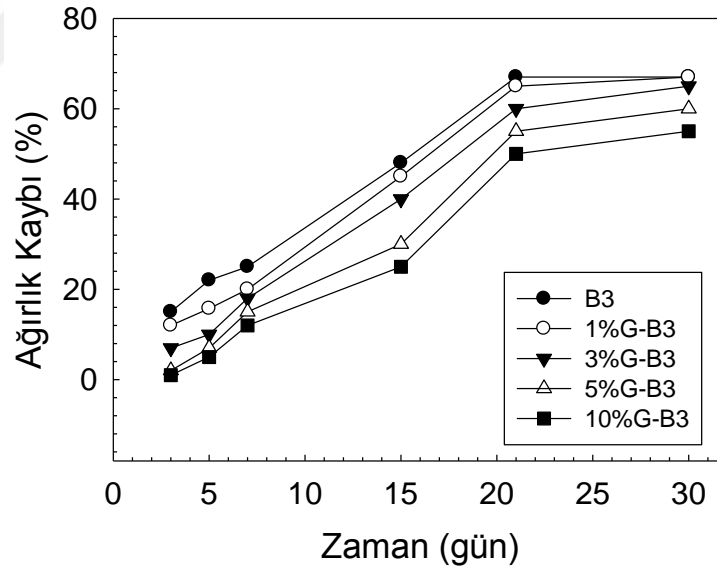
Şekil 4.14.'de 30 gün SBF'te bekletilen numunelerin XRD diyagramları görülmektedir. Daha önceden belirtildiği gibi $2\theta=26,4$ derecede yer alan pik grafenin karakteristik pikidir ve bütün sonuçlarda belirgin olarak görülmektedir. XRD diyagramında $2\theta=32$ derecede görülen geniş pik, nanometre boyutunda HA oluşumunun göstergesi olabilir. XRD analizi sonuçlarına göre SBF'te 30 gün bekletildikten sonra, çalışmada test edilen tüm skafoldlar biyoaktif özellik göstermiştir. FTIR analizinin sonuçlarıyla karşılaştırılınca 30 gün SBF'te bekletildikten sonra tüm kompozit skafoldların yüzeyinde kalsiyum fosfat oluşumu gerçekleştiği anlaşılmıştır.



Şekil 4.14. 30 gün süreyle SBF'te bekletilmiş grafen katkılı 1393-B3 biyoaktif cam skafoldların XRD diyagramları.

Şekil 4.15., farklı konsantrasyonlarda grafen içeren skafoldların ağırlık kaybı verilerini göstermektedir. Buna göre, katkısız 13-93B3 skafold, grafen içeren

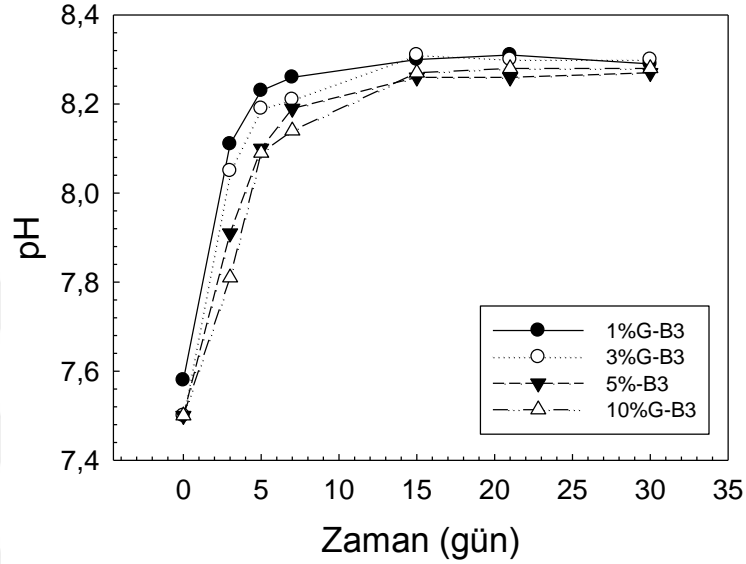
numunelere göre daha yüksek ağırlık kaybı yaşamıştır. 15 gün SBF'te bekletilme sonucunda katkısız 13-93B3 skafoldun ağırlık kaybı %48 değerine ulaşmışken aynı koşullar altında %5G-B3 ve %10G-B3 skafoldlar sırasıyla %30 ve %25 ağırlık kaybına uğramıştır. Buna göre, skafoldların artan grafen konsantrasyonu ile degradasyon hızlarında azalma olduğu görülmektedir. 13-93B3 biyoaktif camın tamamen stokiometrik HA'ya dönüştürüldüğünü varsayarsak, teorik ağırlık kaybı %67 olarak hesaplanmaktadır [150]. Ölçülen ağırlık kaybının teorik değerle karşılaştırıldığında daha düşük olmasına bakılarak grafen içeren skafoldların (ağırlıkça %10) 30 gün SBF'te bekletme sonrasında tamamen HA'ya dönüşmediği söylenebilir. Biyoaktif cam skafoldlarının SBF içinde HA'ya dönüşmesi, Na₂O, K₂O ve B₂O₃'ün çözelti içinde Na⁺, K⁺ ve (BO₃)⁻³ oluşturacak şekilde çözünmesi ardından Ca⁺ iyonlarıyla PO₃'ün cam üzerinde HA tabakası oluşturması şeklinde gerçekleşir [147, 150]. Sonuçlar, grafen içeren 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların katkısız skafoldlara kıyasla daha yüksek kimyasal dayanım sergilediğini göstermiştir.



Şekil 4.15. SBF içerisinde bekletilen biyoaktif cam kompozit skafoldların zamana bağlı ağırlık kayıplarını gösteren grafik.

Deneylerde kullanılan SBF'nin pH değeri (başlangıç değeri = 7,4), grafen içeren biyoaktif cam skafoldların bekletilmesi sonucu zamanla artmıştır (Şekil 4.16.). Skafoldların 7 gün boyunca bekletilmesinden sonra, SBF'nin pH değeri, %10G-B3 numuneleri için 8,14'e yükselmiştir. Aynı şartlar altında, SBF'nin pH değeri 13-93B3

skafoldlar için 8,68 olarak ölçülmüştür. SBF'nin pH değişimi, camın bozunması sırasında ağ değiştiricilerin çözünmesiyle ilişkilendirilmiştir. Katkısız skafold ile karşılaştırıldığında, grafen katkılı skafoldların bekletildiği SBF'lerin düşük pH değerleri, skafoldların ağırlık kaybında elde edilen düşüş ile tutarlıdır. Bu iki sonuç ortak olarak HA dönüşüm oranında gerçekleşen düşüşü işaret etmektedir.

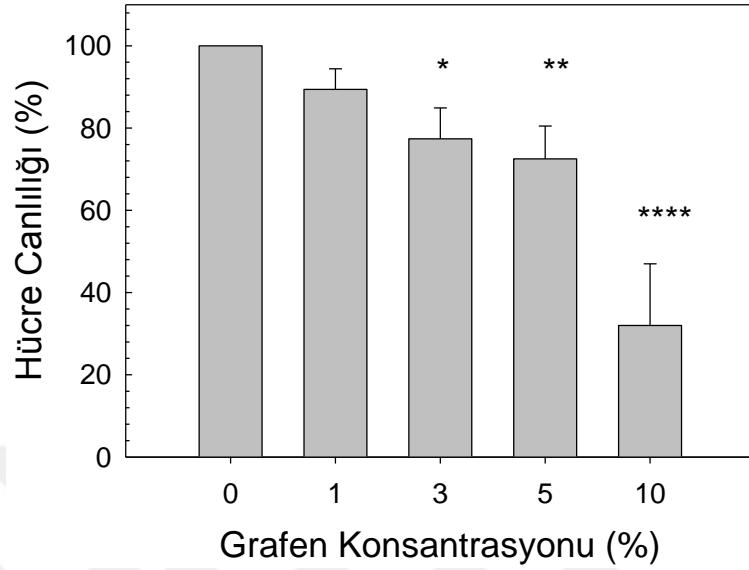


Şekil 4.16. Skafoldların içinde bekletildiği SBF'lerin zamana bağlı pH değişimlerini gösteren grafik.

4.1.5. XTT Analizi

Grafen katkılı kompozit skafoldların biyoyumluluğu XTT testi kullanılarak analiz edilmiştir. Tetrazolyum tuz, hücrel bir mekanizma ile formazan boyadan ayrılır. Bu biyolojik indirgeme işlemi yalnızca yaşayan hücrelerde gerçekleşir ve glikoliz yoluyla NAD(P)H üretimi ile ilgilidir. Bu nedenle formazan miktarı, kültürdeki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile korelasyon gösterir. Deney, bir elektron-birleştirme reaktifinin mevcudiyetinde tetrazolyum tuzunun ayrılmasına ve bir çözünür formazan tuzunun üretilmesine dayanmaktadır. Dönüştürme yalnızca canlı hücrelerde gerçekleştiğinden, ölçülen absorpsiyon canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir [139]. Şekil 4.17., skafold ile inkübe edilen MC3T3-E1 osteoblast hücrelerinin canlılık yüzdesini göstermektedir. 72 saatlik inkübasyondan sonra kontrol grubu numunelerine göre hücre canlılık yüzdelerinde gözlenen fark, %1 grafen içeren gruptan başlayarak belirgindir ve hücre canlılığı, grafen konsantrasyonu ağırlıkça %10'a ulaştığında önemli ölçüde azalmıştır. Bu sonuç,

yüksek miktarda grafen (ağırlıkça %10) içeren skafoldların MC3T3-E1 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

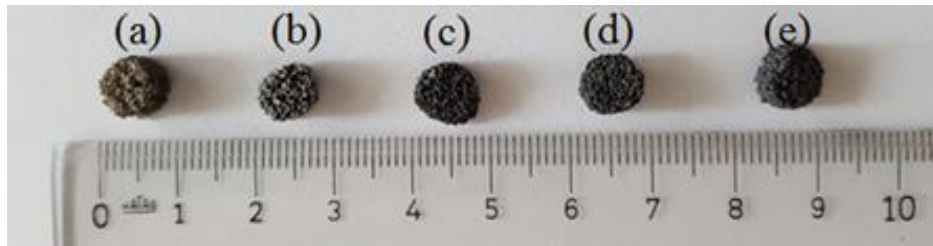


Şekil 4.17. MC3T3-E1 osteoblast hücrelerinin grafen içeren biyoaktif cam skafoldlar üzerindeki canlılık oranlarını gösteren grafik (* $p < 0,05$).

4.2. Grafen İçeren Polikaprolakton Kaplı 13-93B3 Biyoaktif Cam Skafoldlar (Metot II)

4.2.1. Morfolojik Karakterizasyonlar

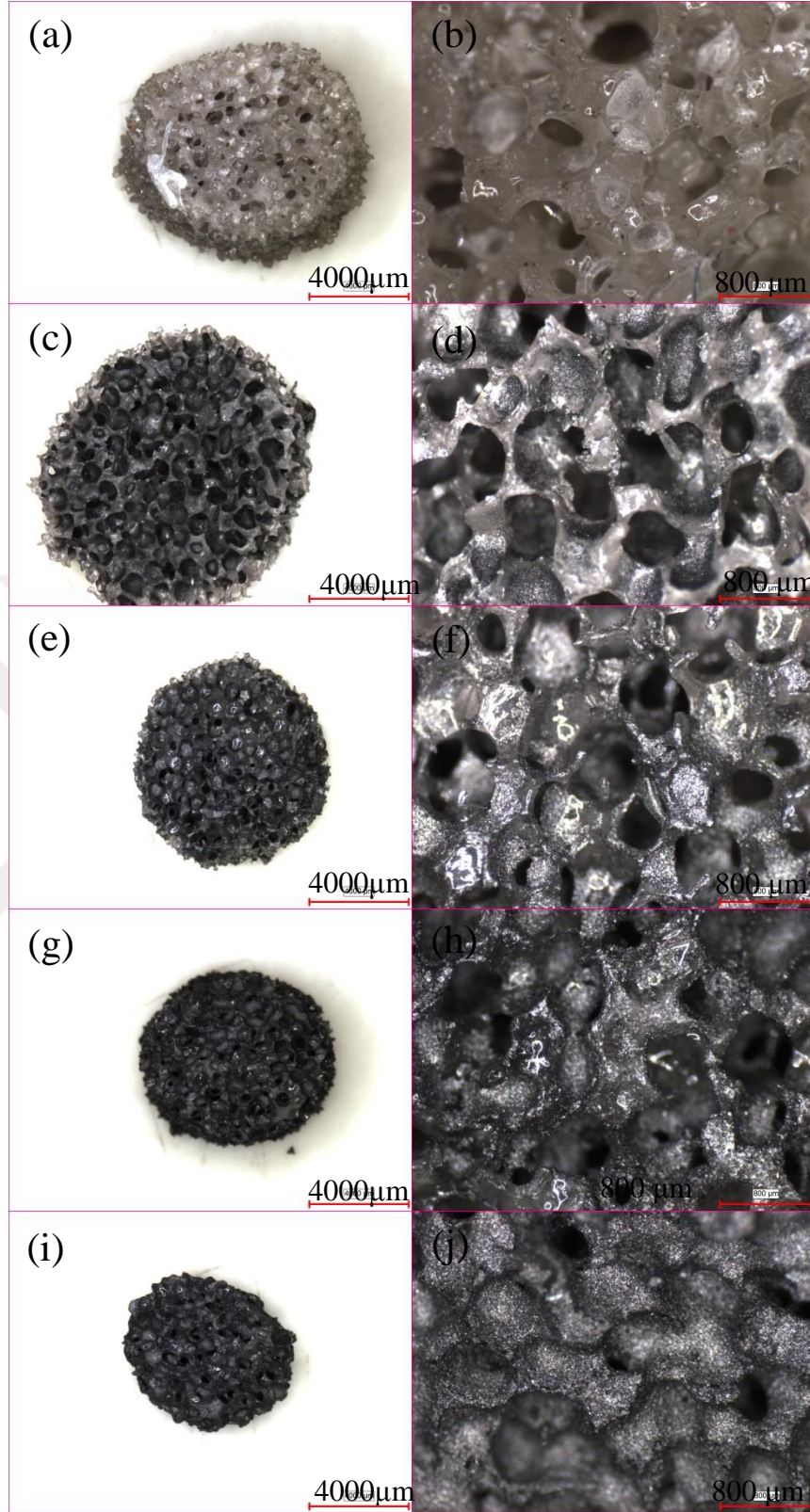
Farklı konsantrasyonlarda grafen nanotozları içeren PCL solüsyonuyla kaplanan bor bazlı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların dijital görüntüleri Şekil 4.18.'da verilmektedir.



Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda grafen içeren PCL kaplanmış 1393B3 skafoldların dijital görüntüleri; (a) PCL-B3, (b) %1G-PCL-B3, (c) %3G-PCL-B3, (d) %5G-PCL-B3, (e) %10G-PCL-B3.

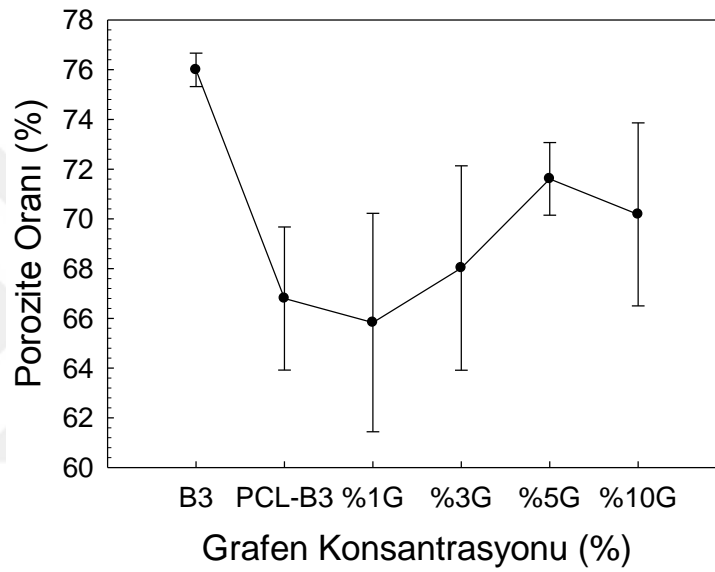
Dijital görüntülerde, katkısız PCL ve grafen içeren PCL kaplı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların benzer morfolojik yapılara sahip oldukları görülmektedir. Optik mikroskop görüntüleri (Şekil 4.19.) incelendiğinde katkısız ve grafen katkılı numunelerde (çap: 7 mm, yükseklik: 3-4 mm) birbirlerine bağlı hücresel poroz yapının üretiminin başarıyla sağlandığı görülmektedir. Skafoldların camsı yapılarını korudukları ve grafen nanoparçacıkların cam matris içerisindeki varlığı anlaşılmıştır. Skafoldların gözenek yapılarında belirgin bir fark olmadığı ve gözenek boyutunun 100-500 µm aralığında olduğu tespit edilmiştir.





Şekil 4.19. PCL ve grafen kaplı numunelerin optik mikroskop görüntüleri; (a)(b) PCL-B3, (c)(d) %1G-PCL-B3, (e)(f) %3G-PCL-B3, (g)(h) %5G-PCL-B3, (i)(j) %10G-PCL-B3.

Skafofldarın PCL ve grafenin varlığıyla porozitelerinin değişip değişmediğini belirlemek amacıyla grafen katkılı PCL ile kaplanan biyoaktif cam skafofldlara Arşimet prensibine göre su emme (su yerine etanol kullanılmıştır) testi uygulanmıştır. Sonuçlar (Şekil 4.20.) incelendiğinde skafofld yapısına PCL'in dâhil olmasıyla porozite oranının yaklaşık %10 oranında düştüğü görülmüştür. PCL-B3 kontrol grubundan sonra grafen oranının yapının porozite oranı üzerinde önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Ancak grafen katkılı numunelerin porozite sonuçları yüksek standart sapmaya sahiptir.

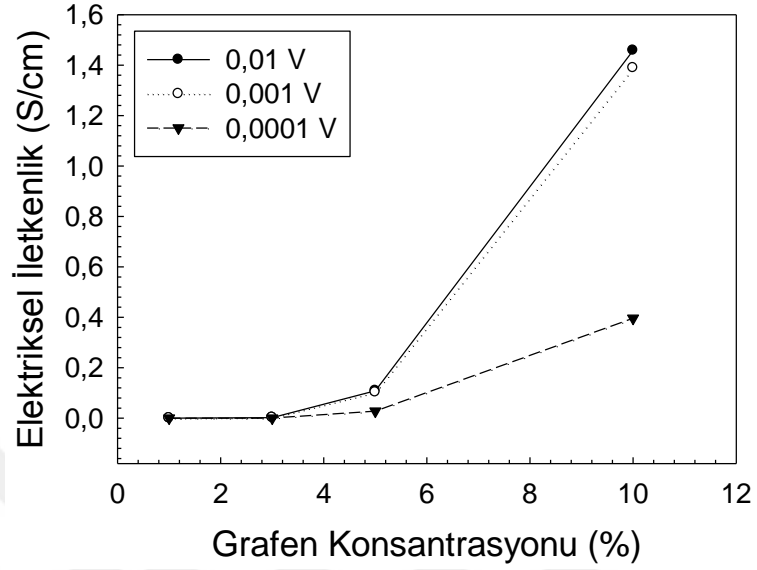


Şekil 4.20. Grafen katkılı PCL ile kaplı 1393-B3 biyoaktif cam skafofldların porozite değerlerini gösteren grafik.

4.2.2. Elektriksel İletkenlik

Çalışmada, skafofldların elektrik iletkenliği, grafen konsantrasyonuna ve uygulanan elektrik voltajına bağlı olarak ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.21.'de verilmiştir. Buna göre, numunelerin elektriksel iletkenliği, grafen nanotoz konsantrasyonuyla birlikte özellikle de ağırlıkça %3 grafen konsantrasyonundan başlayarak artmıştır. Grafen içermeyen PCL kaplı 13-93B3 cam skafofldlarının elektriksel iletkenliği $2,28 \times 10^{-8}$ S/cm olarak ölçülmüştür. Diğer yandan matrise ağırlıkça %3, %5 ve %10 oranlarında grafen ilavesi ile (uygulanan voltaj 0,01V olduğunda) iletkenlik değerlerinin sırasıyla $2,259 \times 10^{-3}$, 0,1087 ve 1,4582 S/cm

değerlerine yükseldiği görülmüştür. Öte yandan, ağırlıkça %1 grafen ilavesinin elektrik iletkenliği önemli seviyede arttırmadığı ($6,029 \times 10^{-8}$ S/cm) anlaşılmıştır.



Şekil 4.21. Metot II'ye göre hazırlanan PCL kaplanmış B3 kompozit skafoldların sahip oldukları iletkenlik değerlerinin grafen konsantrasyonu ile değişimini gösteren grafik.

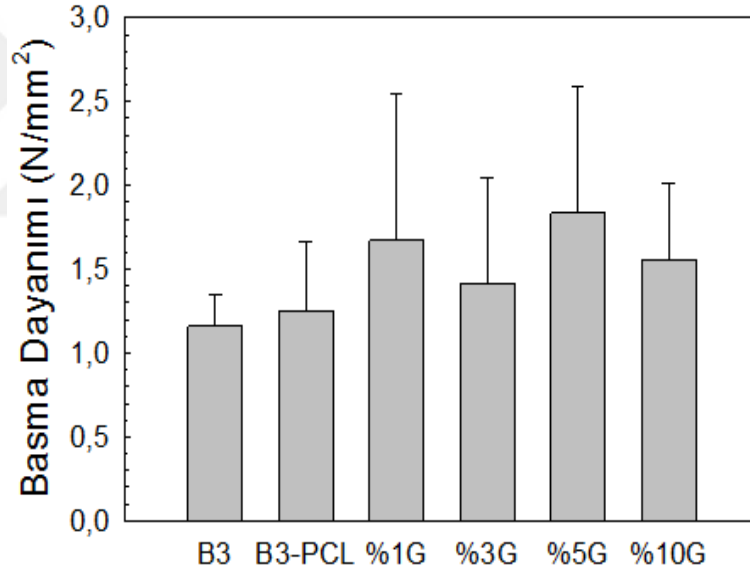
Projenin birinci bölümünde (Metot I) üretilen kompozit skafoldlarla karşılaştırıldığında elde edilen elektriksel iletkenlik değerlerinde belirgin farklılıklar görülmektedir. Her iki yöntemle üretilen skafoldların elektriksel iletkenlik değerleri Tablo 4.1. 'de verilmektedir. Elektriksel iletkenlikler arasındaki bu farklılık grafenin skafoldlar üzerinde homojen bir şekilde dağılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Metot I ile hazırlanan numunelerdeki aglomerasyona bağlı olarak görülen heterojen grafen dağılımı bu farklılığın sebebi olabilir.

Tablo 4.1. Proje kapsamında Metot I ve Metot II kullanılarak üretilen kompozit cam skafoldların elektriksel iletkenlik değerlerini gösteren tablo.

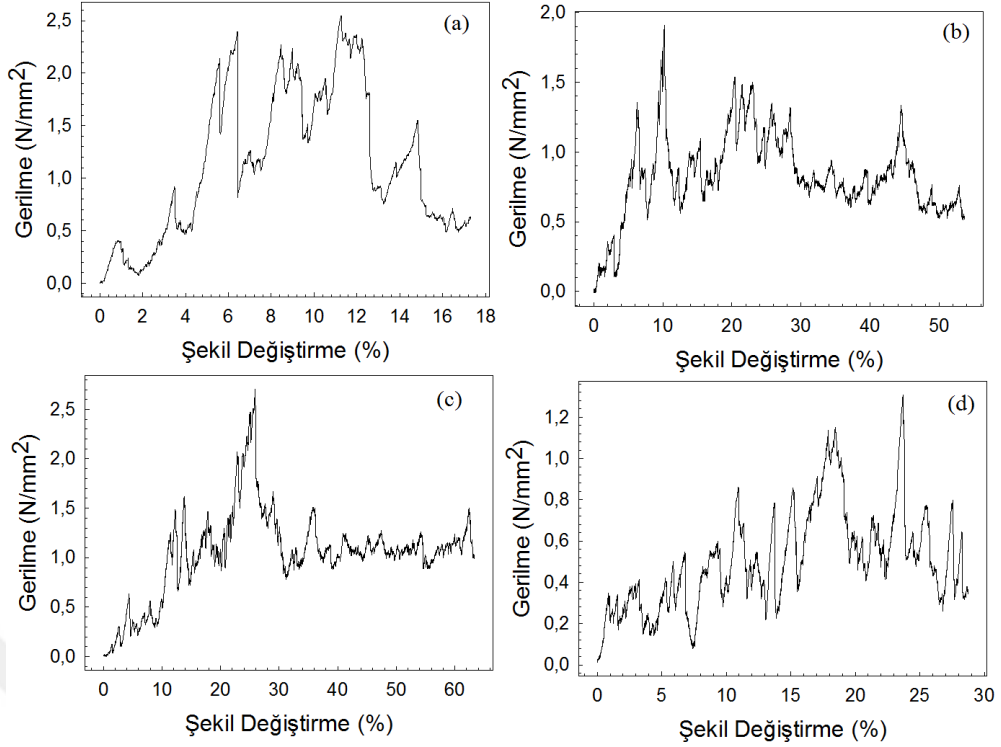
	Elektriksel İletkenlik (S/cm)				
	%0 G	%1 G	%3 G	%5 G	%10 G
Metot I	$2,31 \times 10^{-8}$	$3,2 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^{-6}$	0,0228	0,06
Metot II	$2,28 \times 10^{-8}$	$6,029 \times 10^{-8}$	$2,259 \times 10^{-3}$	0,1087	1,4582

4.2.3. Mekanik Özellikler

Şekil 4.22. ve 4.23.'de çalışmada hazırlanan grafen içeren PCL kaplanmış 13-93B3 kompozit cam skafoldların basma mukavemetleri ve gerilme-şekil değiştirme grafiklerini göstermektedir. PCL kaplamanın skafoldların basma dayanımında bir artışa neden olduğu görülmüştür. Sisteme grafen nanoparçacıklarının eklenmesiyle de basma dayanımı değerlerinde bir artış elde edilmiştir. Katkısız PCL kaplı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların basma dayanımı $1,25 \text{ MPa} \pm 0,4$ olarak ölçülmüşken sisteme ağırlıkça %5 grafen nanotoz ilavesiyle bu değer $1,86 \text{ MPa} \pm 0,7$ değerine yükselmiştir. Buna göre 13-93B3 biyoaktif cam skafoldun PCL ile kaplanmasıyla birlikte basma dayanımında yaklaşık %8'lik bir artış elde edilmişken %5 grafen ilavesiyle beraber artış miktarı yaklaşık %58 seviyesine ulaşmıştır. PCL ayrıca cam matrisi sararak yapının dağılmasına engel olmuş ve basma testlerinde numunelerin gevrek davranış göstermesinin önüne geçmiştir (Şekil 5.23.).



Şekil 4.22. Grafen içeren PCL kaplanmış skafoldların basma dayanım değerlerini gösteren grafik.



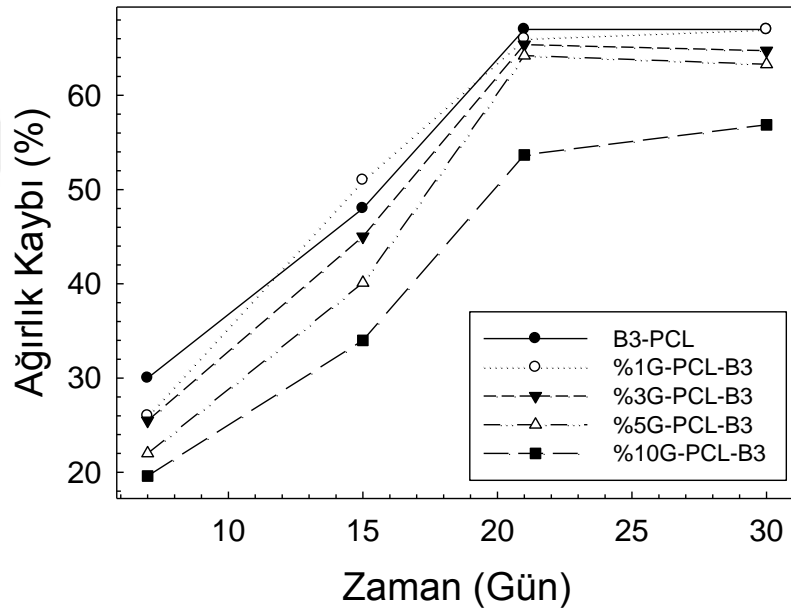
Şekil 4.23. Grafen içeren PCL kaplanmış skafoldların gerilme-şekil değişirme grafikleri: (a) %1G-PCL-B3, (a) %3G-PCL-B3, (a) %5G-PCL-B3, (a) %10G-PCL-B3.

4.2.4. *In Vitro* Degredasyon ve Mineralizasyon Deneyleri

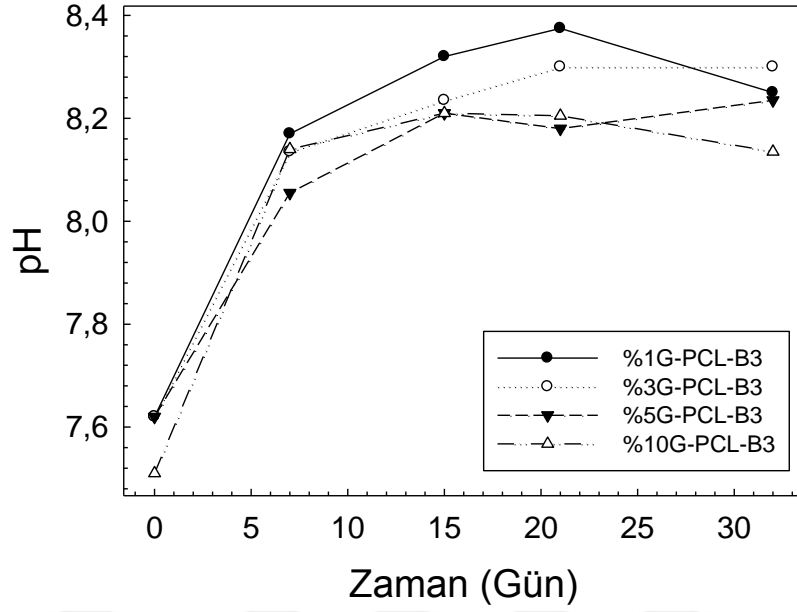
Çalışmada, grafen içeren PCL kaplı biyoaktif cam skafoldların biyomimetik mineralleşme kabiliyeti, 37 °C'de SBF içerisinde incelenmiştir. Şekil 4.24., farklı konsantrasyonlarda grafen içeren skafoldların ağırlık kaybını göstermektedir. Bu sonuçlara göre, grafen içermeyen PCL kaplı 13-93B3 skafoldların ağırlık kaybı, grafen içeren skafoldlara göre daha yüksektir. 7 gün SBF'te bekletilen PCL kaplı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların ağırlık kaybı %30 olarak hesaplanmıştır. Öte yandan, %10 G-PCL-B3 cam skafoldların ağırlık kaybı aynı koşullar altında %19 olarak bulunmuştur. Bor bazlı biyoaktif cam skafoldların bozunması ve fizyolojik sıvılardaki kalsiyum fosfat fazına dönüşmesi; yapıdaki Na_2O , K_2O ve B_2O_3 'ün solüsyon içerisine Na^+ , K^+ , $(\text{BO}_3)^{-3}$ oluşturacak şekilde çözünmesi ve ardından camdaki Ca^{+2} iyonlarıyla çözeltideki PO_3^{-4} 'ün reaksiyona girmesiyle gerçekleşir [58]. Sonuçlar, grafen içeren PCL kaplı 13-93B3 biyoaktif cam skafoldların yüksek grafen konsantrasyonlarında (%10) ağırlık kayıplarının düştüğünü göstermektedir.

Bu durum biyoaktif cam yüzeyinde gerçekleşen HA dönüşüm reaksiyon hızlarının yüksek grafen konsantrasyonunda (%10) azaldığını göstermektedir.

In vitro degradasyon çalışmalarında kullanılan yapay vücut sıvısının (SBF) pH değerlerindeki değişim, skafoldların SBF içerisinde bekletilme sürelerine bağlı olarak ölçülmüştür. Deneylerde kullanılan SBF'lerin pH değerlerinin (başlangıç pH değeri = 7,6) test edilen tüm skafoldlar için zamanın fonksiyonu olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.25.). Skafoldların 7 gün boyunca bekletilmesinden sonra, SBF'nin pH değeri, %10G-PCL-B3 için 7,93'e yükselmiştir. Aynı koşullar altında %1G-PCL-B3 skafoldların içinde bekletildiği SBF'in pH değeri 8,12 olarak ölçülmüştür. Katkısız 13-93B3 biyoaktif cam skafoldlar ile karşılaştırıldığında, grafen kaplanmış skafoldların bekletildiği SBF'lerin daha düşük pH değerlerine sahip olması ağırlık kaybında elde edilen sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir.



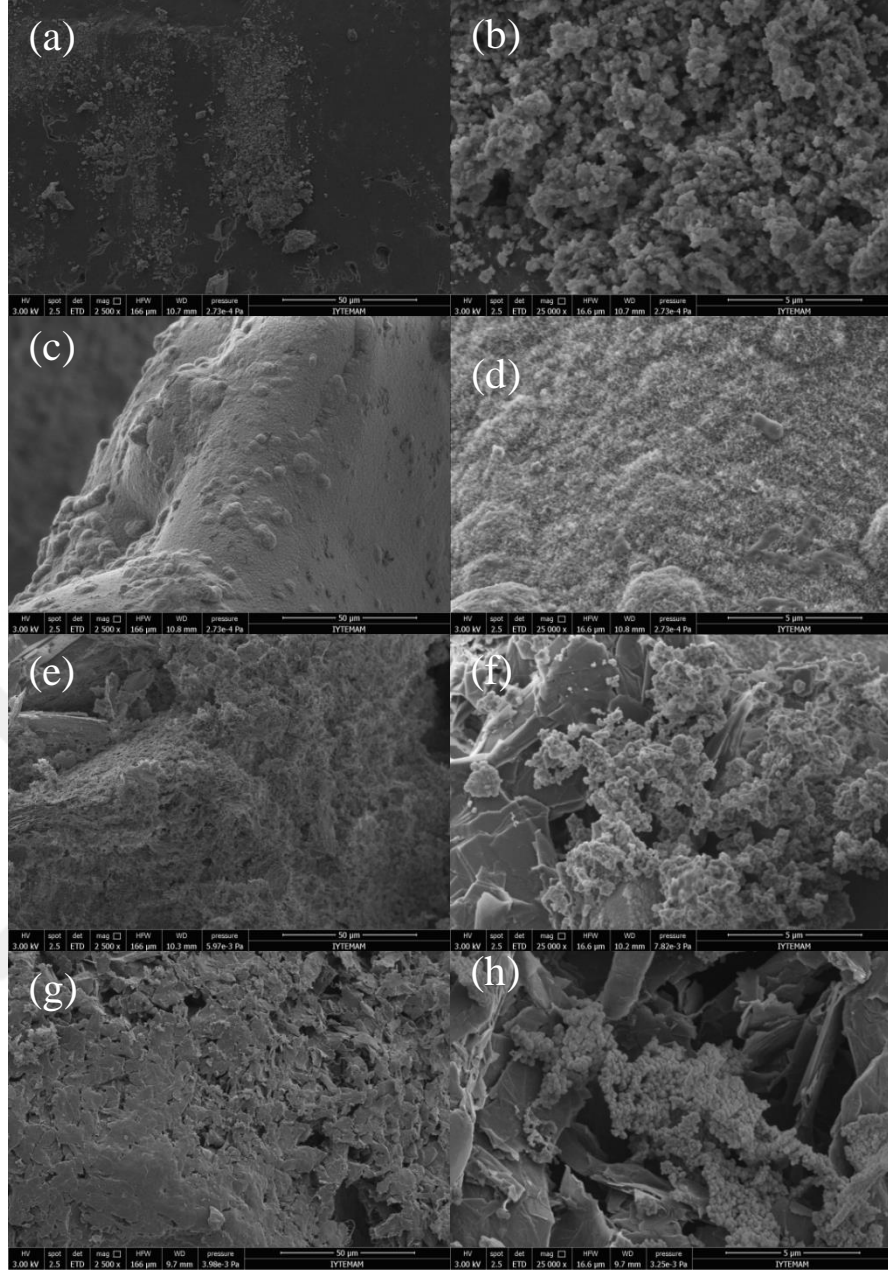
Şekil 4.24. SBF içerisinde bekletilen PCL kaplanmış B3 kompozit skafoldların zamana bağlı ağırlık kayıplarını gösteren grafik.



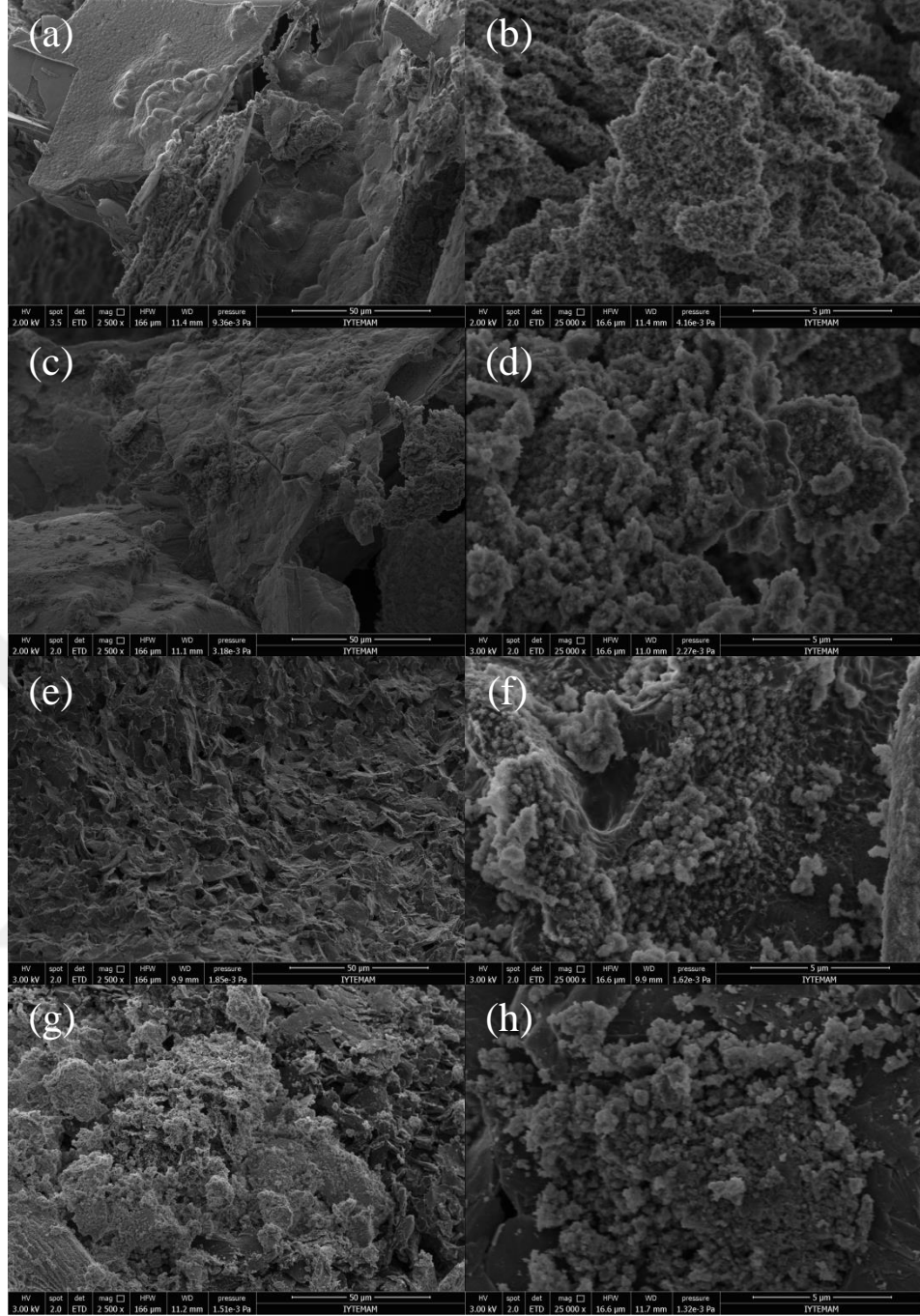
Şekil 4.25. SBF pH değerlerinin skafoldların bekleme süresine bağlı değişimini gösteren grafik.

SBF içerisinde 7 ve 30 gün bekletilen grafen içeren PCL kaplanmış B3 kompozit skafoldların yüzey görüntülerinin düşük ve yüksek büyütmelelerdeki SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.26. ve Şekil 4.27.'de verilmektedir. SBF'te bekletilmiş skafold yüzeylerinde HA benzeri yapıların oluştuğu görülmektedir [147, 152].

Biyoaktif camların yapay vücut sıvısı gibi sulu bir fosfat solüsyonlarına daldırıldıklarında yüzeylerinde amorf kalsiyum fosfat veya HA benzeri bir yapı oluştuğu bilinmektedir [58]. Literatürde bulunan çalışmalarla SEM mikrografları karşılaştırıldığında skafoldların yüzeylerinde oluşan ikinci fazın amorf kalsiyum fosfat veya HA benzeri bir yapı olduğu sonucuna varılmıştır [153, 154].



Şekil 4.26. SBF içerisinde 7 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek: 50 μm) ve yüksek (X25000, ölçek: 5 μm) büyütmelemlerdeki SEM görüntüleri; (a)(b) %1G-PCL-B3, (c)(d) %3G-PCL-B3, (e)(f) %5G-PCL-B3, (g)(h) %10G-PCL-B3.



Şekil 4.27. SBF içerisinde 30 gün bekletilmiş numunelerin düşük (X2500, ölçek: 50 µm) ve yüksek (X25000, ölçek: 5 µm) büyütmelemlerdeki SEM görüntüleri; (a)(b) %1G-PCL-B3, (c)(d) %3G-PCL-B3, (e)(f) %5G-PCL-B3, (g)(h) %10G-PCL-B3.

Şekil 4.27. ayrıca 30 gün SBF'te bekletildikten sonra %1 G-PCL-B3 skafold yüzeyinde yoğun hemisferik ve iğne benzeri HA kristali oluşumunu göstermektedir. Genel olarak, katkısız ve grafen kaplı skafoldların HA oluşturma yeteneğinde önemli bir fark görülmemiştir. En yüksek grafen konsantrasyonunda (ağırlıkça %10) bile, skafold yüzeyinde ikinci faz maddesinin ince parçacıkları görülebilmektedir. Bu

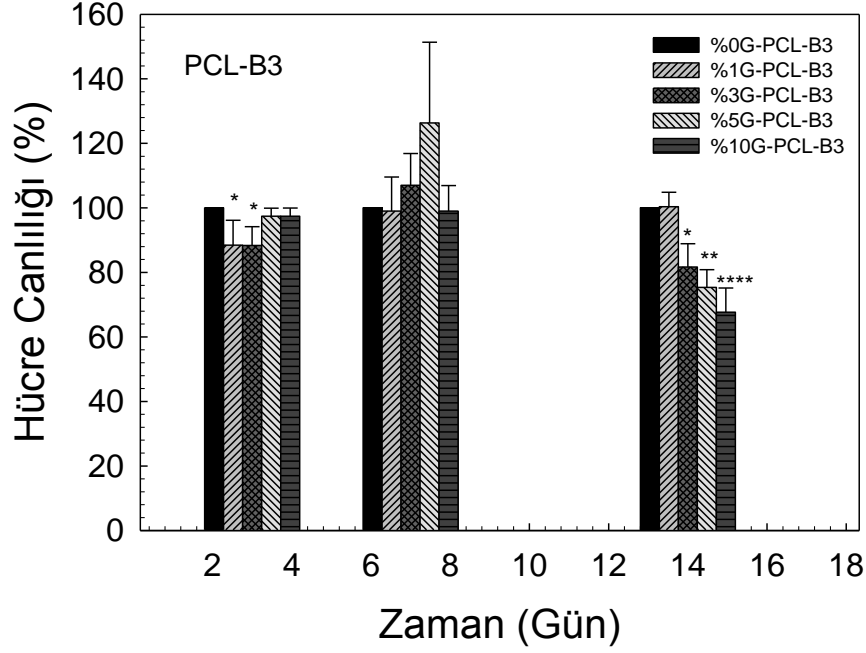
nedenle, grafen içeren PCL kaplamanın, bor bazlı biyoaktif cam skafoldların asellüler biyoaktivitesi üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.2.5. *In Vitro* Hücre Kültürü Testleri

Hazırlanan skafoldların biyouyumluluklarının değerlendirildiği çalışmada, MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin canlılığı, inkübasyondan 3, 7 ve 14 gün sonra XTT metodu ile belirlenmiştir. Şekil 4.28.'de gösterilen sonuçlara göre kontrol grubu skafoldlara kıyasla, grafen kaplı biyoaktif cam skafoldların (tüm grafen konsantrasyonlarında) hücre canlılığında 3 ve 7 günün sonunda önemli bir düşüş görülmemiştir. Ayrıca, grafen içeren örneklerin hücre canlılığı, 7 günlük inkübasyondan sonra kontrol grubu örneklerinden daha yüksektir. Bununla birlikte, ağırlıkça %3'ten başlamak üzere grafen ile kaplanmış numuneler için 14 gün sonra hücre canlılığında artan grafen konsantrasyonuna bağlı olarak azalma görülmüştür. Bu duruma grafen nanotozlarının biyoaktif camın yapısından çözünerek kültür ortamına geçmesi ve bu ortamda serbest halde bulunmasının neden olabileceği düşünülmektedir. Grafen nanoparçacıklar hücre zarında birikerek, yüksek oranda oksidatif stres oluşturabilirler. Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde serbest halde dolaşan radikallerin ve bu radikallere karşı etkiye sahip antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanır. Oksidatif stresin artmasıyla reaktif oksijen türleri meydana gelmektedir ve bu reaktif oksijenler çift bağ içeren gruplar bulunan protein yapılarına ve DNA'da yer alan bazların çift bağlarına saldırır. Bunun sonucunda bu yapılardan bir hidrojen atomu koparır ve zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar. Sonuç olarak bu bahsedilen makromoleküllerin hasarlanmasıyla hücre zedelenmesi hatta hücre ölümü meydana gelmektedir [155].

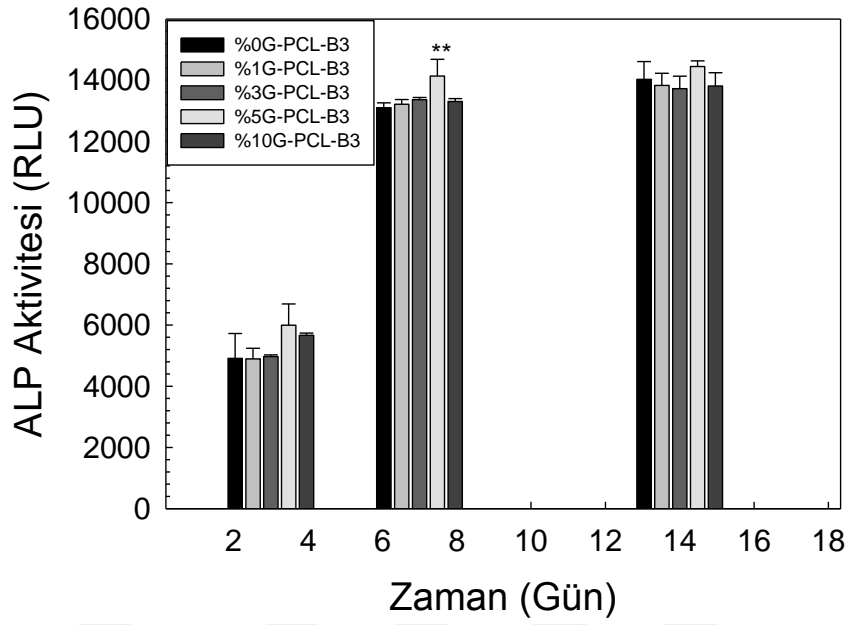
XTT test sonuçları, projenin birinci bölümünde (Metot I kullanılarak hazırlanan) grafen içeren kompozit biyoaktif cam skafoldların sitotoksitesite testleri ile karşılaştırıldığında MC3T3-E1 hücre canlılığının grafen içeren PCL kaplı biyoaktif cam skafoldlarda (Metot II ile üretilen) daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonucun sebebi olarak PCL kaplamanın kültür ortamına serbest halde grafen nanotozlarının geçişini engellemesi gösterilebilir. Ancak 14 günlük inkübasyon sonrasında koruyucu PCL tabakanın kısmen etkisini yitirdiği görülmektedir. 3 günlük inkübasyondan sonra %1 ve %3 grafen içeren örneklerin üzerindeki

hücrelerin canlılık oranı aynı koşullardaki kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermiştir (*, $p < 0,05$). 14 günlük inkübasyonun sonunda ise aynı koşullardaki kontrol grubuyla karşılaştırıldığında %3, %5 ve %10 grafen içeren numunelerdeki hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermiştir ($p < 0,001$ ***).



Şekil 4.28. Grafen içeren PCL kaplanmış B3 skafoldların üzerine ekilen MC3T3-E1 hücrelerinin zamana bağlı canlılık değişimini gösteren grafik (* $p < 0,05$).

Bu çalışmada, MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını araştırmak için alkalın fosfataz (ALP) fosfat-monoester fosfohidrolaz (alkalin optimum) aktivitesi olarak bilinen metaloenzim [156], 3, 7 ve 14 günlük inkübasyondan sonra ölçülmüştür. Skafold içine ekilen hücrelerin ALP aktivitesi, substrat olarak p-nitrofenil fosfat kullanılarak spektrofotometri ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.29., MC3T3-E1 hücrelerinin farklı skafoldlar üzerindeki ALP enzim aktivitelerini göstermektedir. Alkalın fosfatlar, kemik mineralizasyonu ve osteoblast ayırımında çok önemli bir rol oynamaktadır [154, 156]. Her skafold içinde hücre sayısı başına ALP aktivitesi zamanla artmıştır. 3 günlük inkübasyondan sonra özellikle %5G-PCL-B3 numunelerinde olmak üzere %5 ve %10 grafen içeren skafoldlarda, grafen içermeyen PCL-B3 numunelerle karşılaştırıldığında ALP aktivitelerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. 7 ve 14 günlük inkübasyonda %5G-PCL-B3 numuneler tek başına diğer numunelerden daha yüksek ALP aktivitesi göstermiştir (**, $p < 0,01$).

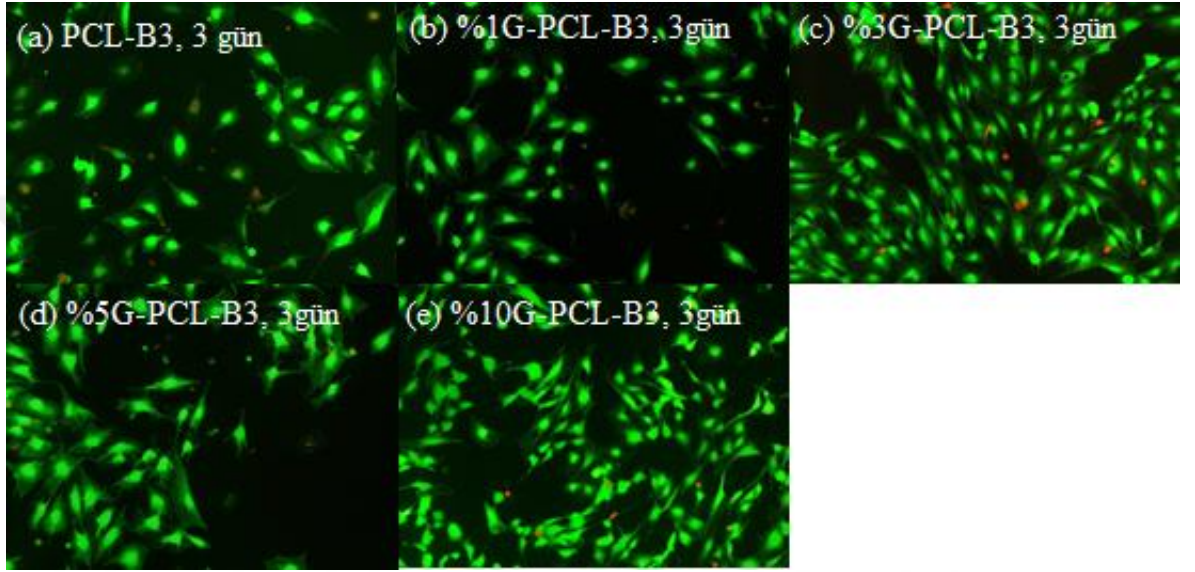


Şekil 4.29. PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldlar ALP aktivitesinin zamana bağlı değişimini gösteren grafik (** p<0,01).

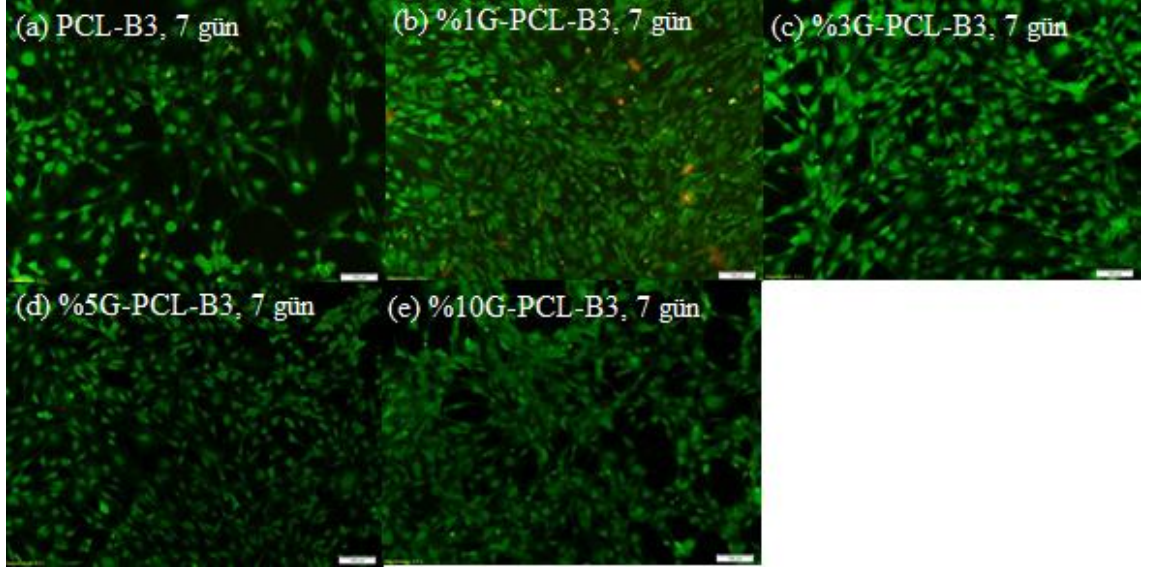
Kompozit skafoldlar üzerine ekilen MC3T3-E1 hücrelerin canlılığının ve yapışmasının grafen konsantrasyonuna bağlı değişimini görsel olarak incelemek amacıyla 3, 7 ve 14. günlerde calcein-AM ve propidyum iyodür (PI) floresans boyama gerçekleştirilmiştir. calcein-AM'in kendisinin floresans bir molekül değildir ancak yaşayan bir hücrede bulunan esterase ile Calcein-AM'den üretilen calcein güçlü bir yeşil floresans yayar. Bundan dolayı Calcein-AM yalnızca canlı hücreleri boyar. Öte yandan PI, hücre çekirdeğini boyayabilen bir boyadır ve canlı bir hücre zarı içinden geçemez. Hem Calcein hem de PI-DNA, 490 nm ışık ile uyarılabilir. Bu nedenle, floresans mikroskop kullanılarak canlı ve ölü hücrelerin izlenmesi mümkündür [157].

MC3T3-E1 hücre ekimi yapılmış skafoldların 3, 7 ve 14 günlük inkübasyon sonrasında floresans boyaması yapılan örneklere ait görüntüler sırasıyla Şekil 4.30., Şekil 4.31. ve Şekil 4.32.'de verilmektedir. Şekil 4.30.'da bulunan 3 günlük inkübasyon görüntülerine bakıldığında grafen konsantrasyonunun yeşil renkle temsil edilen canlı hücre miktarı üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadığı görülebilmektedir. Aynı durum Şekil 4.31.'de verilen 7 günlük inkübasyon sonundaki görüntülerde de mevcuttur. Bununla birlikte, hücre ekimi sonrası 14.

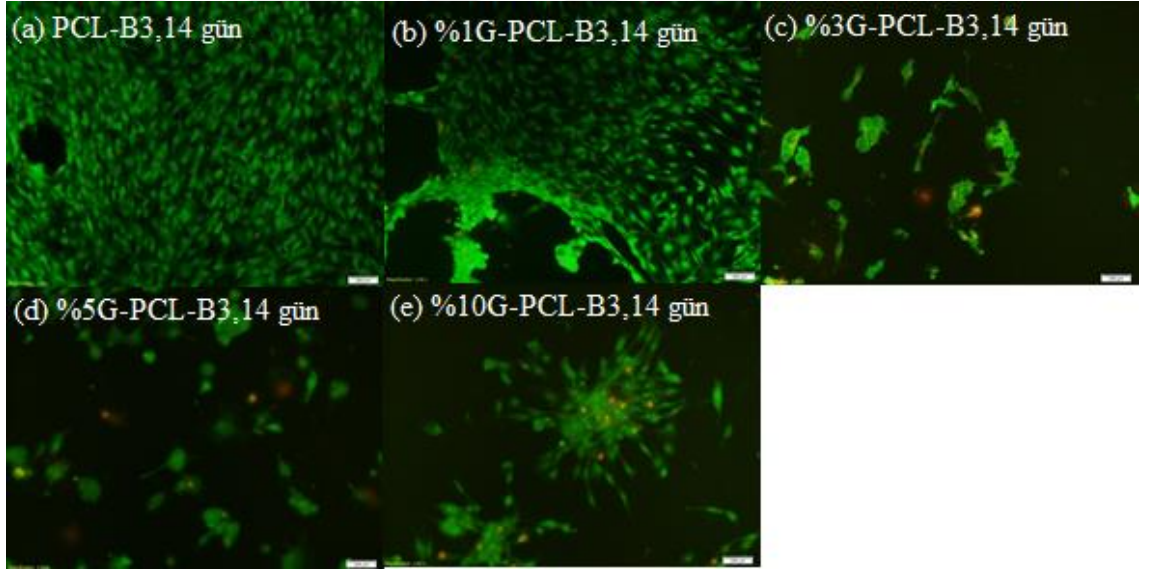
günde (Şekil 4.32.) alınan görüntülerde PCL-B3 ve %1G-PCL-B3 numunelerdeki hücre canlılığı yüksek iken grafen miktarının artmasıyla hücre canlılığında hızlı bir düşüş gerçekleşmiştir. Floresans boyama ile yapılan Canlı/Ölü hücre testi deneylerinde elde edilen sonuçlar XTT testlerinin sonuçları ile tutarlılık göstermiştir. Hücre kültürlerine ait faz kontrast mikroskopu görüntülerinde (Şekil 4.33.) 7 günün sonunda yüksek olan hücre yoğunluğu 14. günde düşüş göstermiştir. Bu durum hem XTT hem de floresans boyama testi sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir.



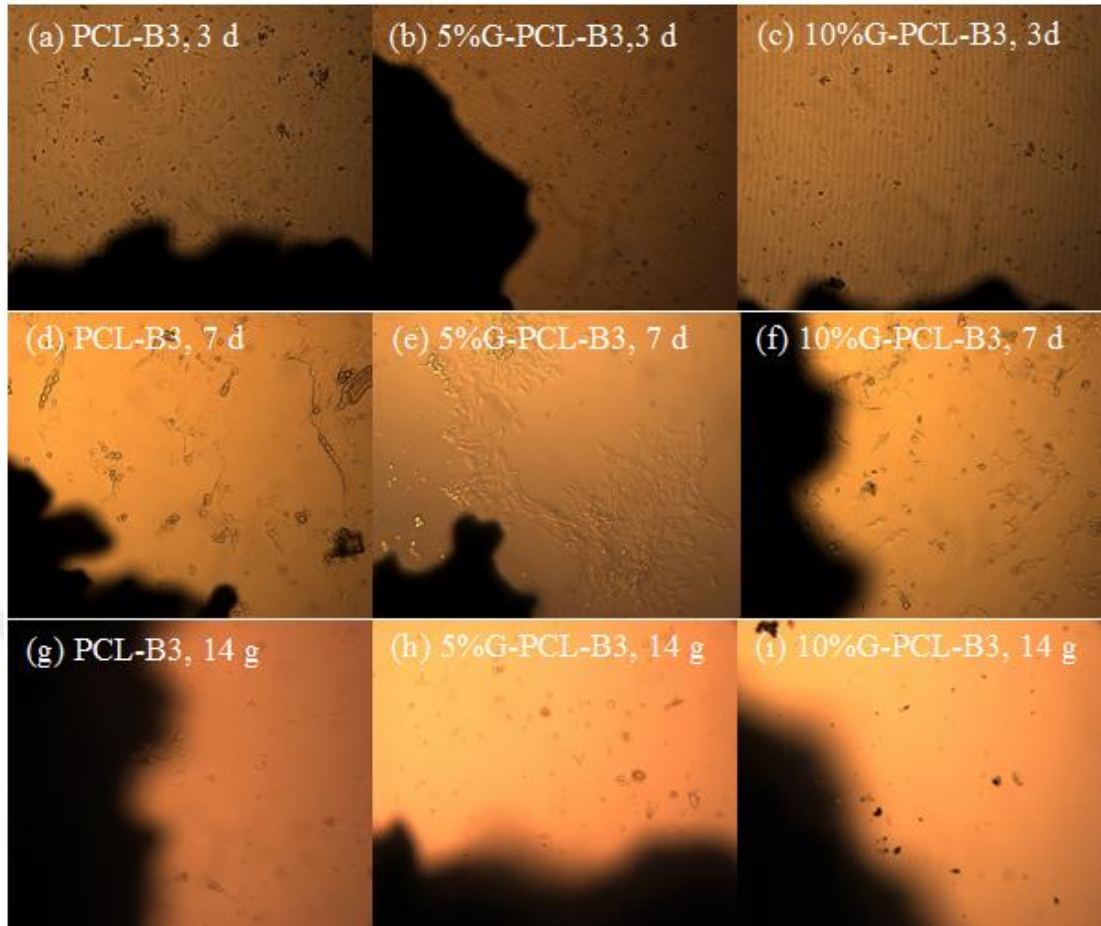
Şekil 4.30. Hücre kültürü sonrası (3 gün) floresans boyama yapılan grafen içeren PCL kaplı 13-93B3 örneklerin mikroskop görüntüleri (Büyütme x200).



Şekil 4.31. Hücre kültürü sonrası (7 gün) floresans boyama yapılan grafen içeren PCL kaplı 13-93B3 örneklerin mikroskop görüntüleri (Büyütme x200).



Şekil 4.32. Hücre kültürü sonrası (14 gün) floresans boyama yapılan grafen içeren PCL kaplı 13-93B3 örneklerin mikroskop görüntüleri (Büyütme x200).

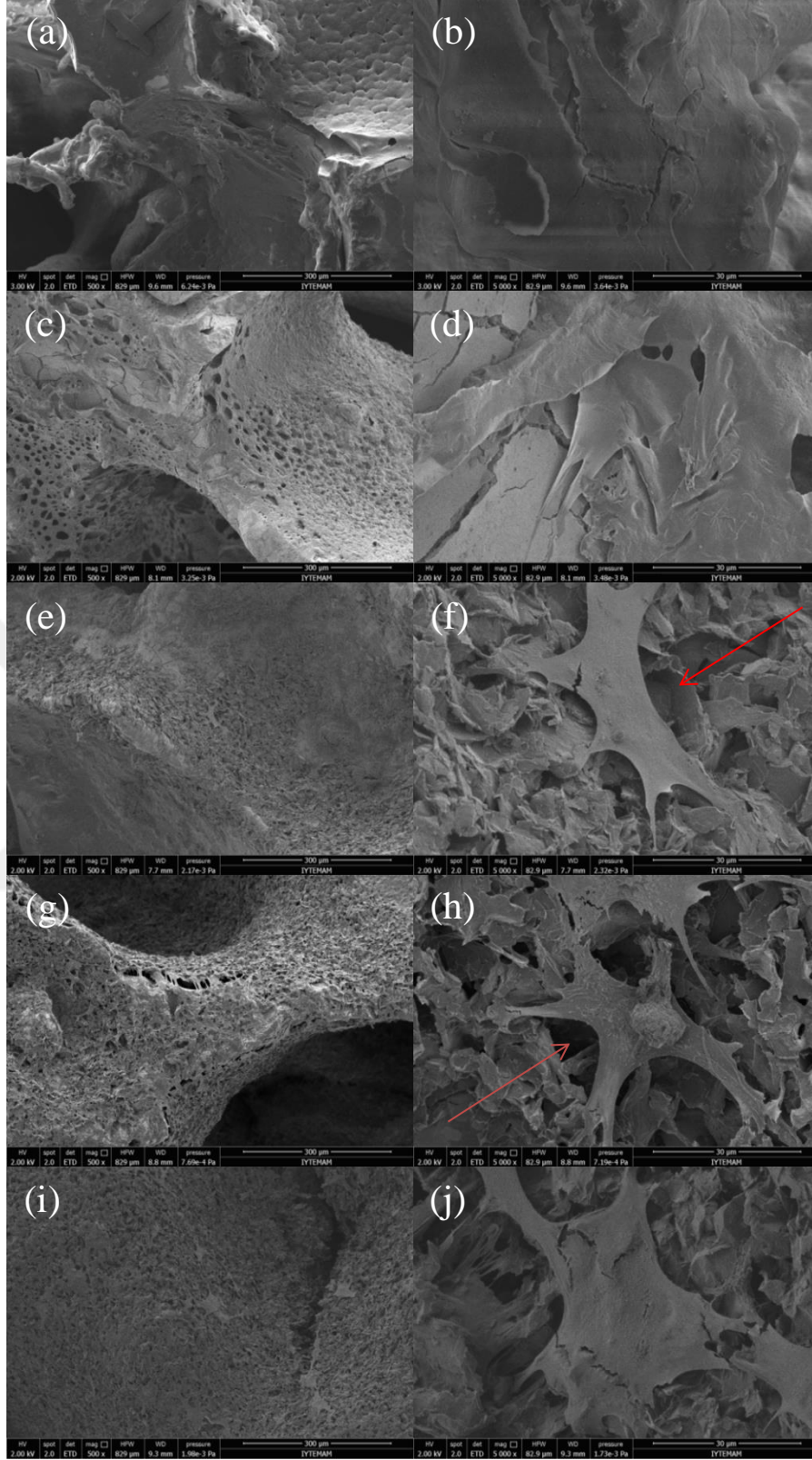


Şekil 4.33. Grafen içeren PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldlar üzerine ekilen MC3T3-E1 ücrelerinin faz kontrast mikroskobuyla alınan görüntüleri; (a)(d)(g) PCL-B3, (b)(e)(h) %5G-PCL-B3, (c)(f)(i) %10G-PCL-B3 (Büyütme X200).

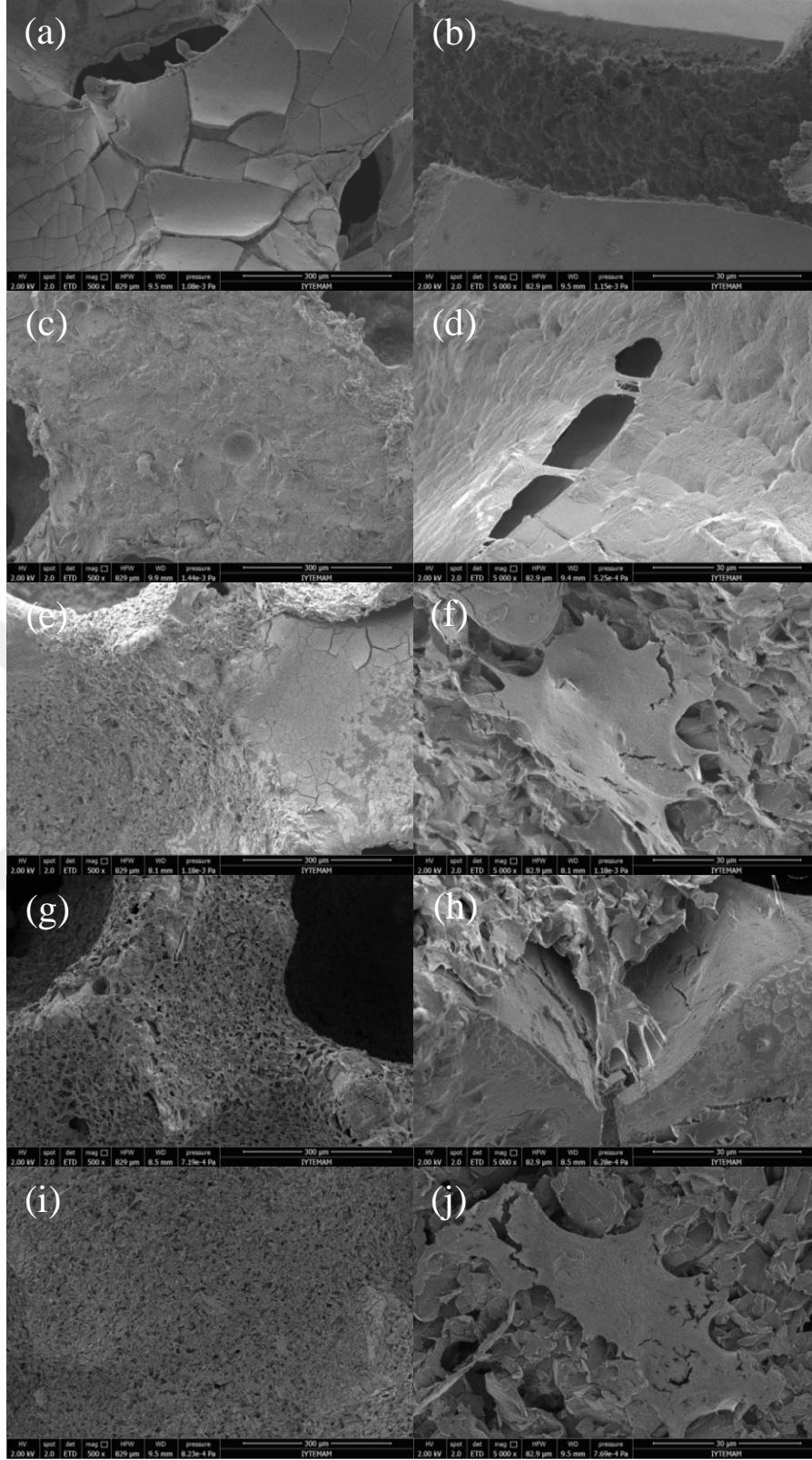
Skafold üzerinde tohumlanan hücrelerin morfolojisini araştırmak için SEM analizi yapılmıştır. 3, 7 ve 14 günlük inkübasyon sonunda SEM mikrografları çekilen numuneler Şekil 4.34, 4.35. ve 4.36.'te görülebilmektedir. Sonuçlar, yüzeyde yayılan MC3T3-E1 hücrelerinin, 3 gün inkübasyon süresinden itibaren tüm skafoldlar üzerinde yatay bir doğrultuda yayıldığını göstermektedir. Hücreler, skafoldların yüzeyinde yalancı ayaklar (psödopodlar) vasıtasıyla yayılmışlardır. 3 günlük inkübasyon süresi sonunda çekilen SEM mikrograflarında MC3T3-E1 hücrelerin PCL-B3 ve %1G-PCL-B3 skafoldlarının yüzeyinde hızlı bir şekilde yayılarak tüm yüzeyi kapladığı görülmüştür. %3G-PCL-B3, %5G-PCL-B3 ve %10G-PCL-B3 örneklerinde ise aynı süreçte hücrelerin psödopodlar vasıtasıyla yayılmaları başlangıç aşamasındadır. 7 ve 14 günlük inkübasyon süreci sonunda çekilen mikrograflara bakılacak olursa %3G-PCL-B3, %5G-PCL-B3 ve %10G-PCL-B3 örneklerde 3 günlük görüntülere kıyasla hücre yayılması artış göstermiş ancak yine

de yüzeyin tamamen kaplanması söz konusu olmamıştır. PCL-B3 ve %1G-PCL-B3 numunelerde ise mevcut durumun devam ettiği görülmüştür. Ayrıca, mineralize nodüller PCL-B3 ve %1G-PCL-B3 skafoldlarının kültürlerinin 7 ve 14 günlerinde görülmüştür. Sonuç olarak, grafen konsantrasyonunun artmasıyla hücre yayılma alanındaki bir azalma görüldüğü sonucuna varılabilmektedir. Bu sonuçlar, XTT testi ve floresans boyama testi sonucunda elde edilen verilerle tutarlılık göstermektedir.

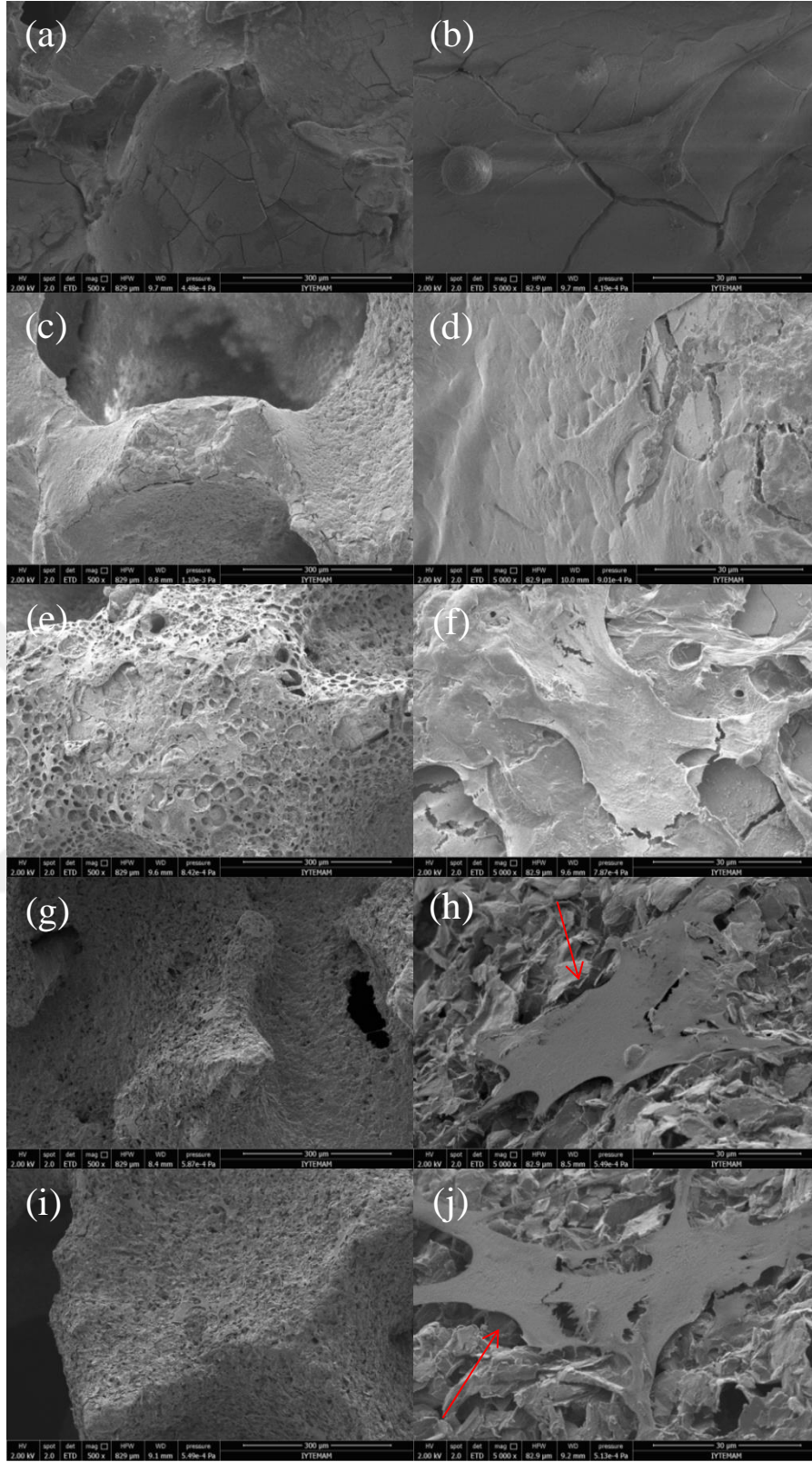




Şekil 4.34. Hücre kültürünün 3. gününde grafen içeren PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldların üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri; (a)(b) PCL-B3, (c)(d) %1G-PCL-B3, (e)(f) %3G-PCL-B3, (g)(h) %5G-PCL-B3, (i)(j) %10G-PCL-B3.



Şekil 4.35. Hücre kültürünün 7. gününde grafen içeren PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldların üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri; (a)(b) PCL-B3, (c)(d) %1G-PCL-B3, (e)(f) %3G-PCL-B3, (g)(h) %5G-PCL-B3, (i)(j) %10G-PCL-B3.



Şekil 4.36. Hücre kültürünün 14. gününde grafen içeren PCL kaplanmış biyoaktif cam skafoldların üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri; (a)(b) PCL-B3, (c)(d) %1G-PCL-B3, (e)(f) %3G-PCL-B3, (g)(h) %5G-PCL-B3, (i)(j) %10G-PCL-B3.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Proje kapsamında grafen nanotozları içeren, bor bazlı ve gözenekli 13-93B3 biyoaktif cam skafoldlar, polimer köpük replikasyonu yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Bu amaçla 2 farklı üretim metodu uygulanmıştır. Birinci yöntemde grafen nanotozları (ağırlıkça % 1, 3, 5, 10) biyoaktif cam matris içine doğrudan eklenmiş sonrasında skafoldlara 570 °C’ de hava ortamında ısıl işlem uygulanmıştır. Sinterlenmiş olan kompozit skafoldların fiziksel, mekanik özellikleri, biyoaktivitesi ve biyouyumluluğu incelenmiştir. XRD analiz sonuçları, hazırlanan kompozit skafoldların yapısında grafene ait piklerin mevcut olduğunu göstermektedir. Buna göre yapıdaki grafen hava ortamında gerçekleşen ısıl işlem sonucu yapıyı terk etmemiş ya da oksitlenmemiştir. Sonuçlar ayrıca biyoaktif cam matris içine grafen eklenmesinin, (%5 grafen konsantrasyonundan itibaren) skafoldların elektriksel iletkenliğinde önemli bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Diğer yandan hazırlanan skafoldların basma dayanımlarında genel olarak grafen konsantrasyonuna bağlı olarak önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. %10 grafen içeren skafoldların basma dayanımlarında bir yükselme kaydedilmiş olsa da bu durumun yüksek grafen konsantrasyonunda düşen gözeneklilik oranı ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Öte yandan, FTIR ve SEM analizlerine dayanarak, grafen konsantrasyonuna ve SBF içerisinde bekletilme sürelerine (7, 14 gün) bağlı olarak numunelerin HA oluşturma kabiliyetlerinde bir miktar düşüş gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 30 gün süreyle SBF’te bekletilen bütün numunelerde HA oluşumunun gerçekleştiği XRD sonuçları tarafından onaylanmıştır. MC3T3-E1 osteoblast benzeri hücrelerle gerçekleştirilen hücre testleri sonucunda XTT analizleri, grafen konsantrasyonunun artmasıyla (özellikle %10G-B3) skafoldların toksik yanıt oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bunun sebebi olarak yüksek degradasyona sahip bor bazlı 13-93B3 skafoldların ortamda hızlıca çözünerek bünyelerinde barındırdıkları grafeni kültür ortamına salmaları ve serbest halde dolaşan grafenin hücrelere karşı toksik etki yaratması olarak gösterilmiştir. Ayrıca 1393-B3 cam skafoldların statik ortamda yapılan *in vitro* hücre kültürü testlerinde lokal bor konsantrasyonlarında ani artışa bağlı olarak pek çok hücre grubu üzerinde toksik etki gösterdiği bilinmektedir. Bu durumu önlemek için testlerin dinamik koşullar altında ya da *in vivo* olarak yapılması önerilmektedir. Sonuçlar, Metot I’e göre üretilen kompozitlerin elektriksel iletkenliğinin (ağırlıkça %5 grafen’den başlayarak) bir elektrik stimülasyonla hücre

büyümesini teşvik etmek için yeterli olduğunu göstermiştir. Biyoaktivite, XTT ve elektriksel iletkenlik testleri bir arada incelenecek olursa Metot I'e göre üretilen bor bazlı biyoaktif cam skafoldlarında optimum grafen katkısı oranının %5 olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir.

Skafoldların hazırlanmasında kullanılan ikinci yöntemde ise katkısız 13-93B3 cam skafoldlar polimer köpük replikasyonu hazırlanarak, birinci yöntemle aynı koşullar altında 570 °C'de sinterlendikten sonra yüzeyleri daldırma yöntemi ile grafen nanotozları içeren (ağırlıkça % 1, 3, 5, 10) %5'lik polikaprolakton solüsyonu ile kaplanmıştır. Sonuçlar, PCL kaplı 13-93B3 skafoldların elektrik iletkenliği ve basma dayanımının grafenin varlığında arttığını göstermiştir. Yapay vücut sıvısı içinde yapılan *in vitro* mineralizasyon çalışmaları en yüksek grafen konsantrasyonuna sahip skafoldların yüzeyinde bile kalsiyum fosfat bazlı nanoparçacıkların çökeldiğini ve yüzeyi kapladığını göstermiştir. Bu nedenle, grafen içeren PCL kaplamanın bor bazlı biyoaktif cam skafoldların asellüler biyoaktivitesi üzerinde herhangi olumsuz bir etkiye neden olmadığı sonucuna varılmıştır. Hazırlanan skafoldların biyoyumluluğunun tespiti için MC3T3-E1 hücreleri kullanılarak yapılan sitotoksitesite testleri (XTT analizi ve floresans boyama) sonucunda 7 gün inkübasyon süresinin sonunda grafen içeren skafoldların hücre canlılık yüzdesi kontrol grubu örneklerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, 14 günlük inkübasyon süresi sonunda grafen içeren (ağırlıkça %3 'ten itibaren) PCL kaplı örneklerin üzerine ekilen hücrelerin canlılığında azalma elde edilmiştir. Bu duruma, PCL kaplı bor bazlı skafoldların belirtilen süre sonunda çözünmeye başlayarak grafen nanotozlarını büyüme ortamına salmasının neden olabileceği sonucuna varılmıştır. Metot I ile üretilen skafoldların aksine Metot II ile üretilen skafoldlarda 13-93B3 cam matrisi kültür ortamında çözünse de yapıdaki PCL grafeni tutmuş ve kültür ortamında serbestçe dolaşarak toksik etki göstermesini engellemiştir. ALP aktivitesi, hücrelerin osteoblastik farklılaşmasını sağlayan tüm skafoldlarda zamanla artmıştır. SEM analizleri MC3T3-E1 hücrelerinin, 3 günlük inkübasyondan başlayarak, tüm skafold gruplarında yüzeye ve gözeneklere tutunarak yayıldığı ve ECM oluşumunu başlattığını göstermiştir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde grafen içeren bor bazlı biyoaktif cam skafoldların özellikle kemik doku mühendisliği uygulamalarında

kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında 1393-B3 kompozisyonunun hızlı iyon salımı yapması sonucu ortaya çıkabilecek olumsuzlukların önüne geçilmesi için deneylerin dinamik koşullar altında (çalkalamalı inkübatör ile) ya da *in vivo* olarak yapılması daha uygun olacaktır. Ayrıca hazırlanan skafodların, hücre kültürü deneylerinin elektrik alan varlığında da yapılması skafodların elektrik stimülasyon uygulaması için uygunluğunun test edilmesi açısından önemli olacaktır.



KAYNAKLAR

- [1] Wang, E. T. ve Zhao, M., “Regulation of tissue repair and regeneration by electric fields”, *Chinese Journal of Traumatology - English Edition*, c. 13, sayı 1, ss. 55–61, 2010.
- [2] Dubey, N., Bentini, R., Islam, I., Cao, T., Castro Neto, A. H., ve Rosa, V., “Graphene: A Versatile Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering”, *Stem Cells International*, c. 2015, ss. 18–23, 2015.
- [3] Liu, Y., Huang, J., Niinomi, M., ve Li, H., “Inhibited grain growth in hydroxyapatite-graphene nanocomposites during high temperature treatment and their enhanced mechanical properties”, *Ceramics International*, c. 42, sayı 9, ss. 11248–11255, 2016.
- [4] Hench, L. L., “The story of Bioglass®”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, c. 17, sayı 11, ss. 967–978, Kas. 2006.
- [5] Gerhardt, L.-C. ve Boccaccini, A. R., “Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Materials*, c. 3, sayı 7, ss. 3867–3910, 2010.
- [6] Brink, M., Turunen, T., Happonen, R. P., ve Yli-Urpo, A., “Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system Na₂O-K₂O-MgO-CaO-B₂O₃-P₂O₅-SiO₂.”, *Journal of biomedical materials research*, c. 37, sayı 1, ss. 114–21, 1997.
- [7] Jin, G. ve Li, K., “The electrically conductive scaffold as the skeleton of stem cell niche in regenerative medicine”, *Materials Science and Engineering C*, c. 45, ss. 671–681, 2015.
- [8] Touri, R., Moztarzadeh, F., Sadeghian, Z., Bizari, D., Tahriri, M., ve Mozafari, M., “The Use of Carbon Nanotubes to Reinforce 45S5 Bioglass-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications”, *BioMed Research International*, c. 2013, ss. 1–8, 2013.
- [9] Fabbri, P., Valentini, L., Hum, J., Detsch, R., ve Boccaccini, A. R., “45S5 Bioglass®-derived scaffolds coated with organic-inorganic hybrids containing

- graphene”, *Materials Science and Engineering C*, c. 33, sayı 7, ss. 3592–3600, 2013.
- [10] Liu, J., Gao, C., Feng, P., Xiao, T., Shuai, C., ve Peng, S., “A bioactive glass nanocomposite scaffold toughed by multi-wall carbon nanotubes for tissue engineering”, *Nippon Seramikkusu Kyokai Gakujutsu Ronbunshi/Journal of the Ceramic Society of Japan*, c. 123, sayı 1438, ss. 485–491, 2015.
- [11] Fan, Z., Wang, J., Liu, F., Nie, Y., Ren, L., ve Liu, B., “A new composite scaffold of bioactive glass nanoparticles/graphene: Synchronous improvements of cytocompatibility and mechanical property”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, c. 145, ss. 438–446, 2016.
- [12] Gao, C., Liu, T., Shuai, C., ve Peng, S., “Enhancement mechanisms of graphene in nano-58S bioactive glass scaffold: mechanical and biological performance.”, *Scientific reports*, c. 4, s. 4712, 2014.
- [13] Porwal, H., Grasso, S., Cordero-Arias, L., Li, C., Boccaccini, A. R., ve Reece, M. J., “Processing and bioactivity of 45S5 Bioglass®-graphene nanoplatelets composites”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, c. 25, sayı 6, ss. 1403–1413, 2014.
- [14] Langer, R. ve Vacanti, J. P., “Tissue engineering”, *Science*, c. 260, sayı 5110, ss. 920–926, 1993.
- [15] Nerem, R. M. ve Sambanis, A., “Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes”, *Tissue Engineering*, c. 1, sayı 1, ss. 3–13, 1995.
- [16] Jagur-Grodzinski, J., “Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies”, *Polym. Adv. Technol.*, c. 17, sayı April, ss. 395–418, 2006.
- [17] Lavik, E. ve Langer, R., “Tissue engineering: current state and perspectives”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, c. 65, sayı 1, ss. 1–8, 2004.
- [18] Johnson, R. J., Bradbury, L. L., Martin, K., ve Neuberger, J., “Organ Donation and Transplantation in the UK—The Last Decade”, *Transplantation Journal*,

c. 97, sayı 1, ss. S1–S27, 2014.

- [19] Huri, P. Y., Hasırcı, N., ve Hasırcı, V., “Kemik Doku Mühendisliği”, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana, 2010.
- [20] Wintermantel E, Mayer J, Blum J, Eckert KL, Luscher P, ve Mathey M., “Tissue engineering scaffolds using superstructures.”, *Biomaterials*, c. 17, sayı 2, ss. 83–91, 1996.
- [21] Hynes, R. O., “The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils”, *Science*, c. 326, sayı November, s. 2009, 2009.
- [22] McCarthy, J. ve Turley, E. A., “Effects of extracellular matrix components on cell locomotion”, *Crit Rev Oral Biol Med*, c. 4, sayı 5, ss. 619–637, 1993.
- [23] Cao, Y., Croll, T. I., Lees, J. G., Tuch, B. E., ve Cooper-White, J. J., “Scaffolds, stem cells, and tissue engineering: A potent combination!”, *Australian Journal of Chemistry*, c. 58, sayı 10, ss. 691–703, 2005.
- [24] Günaydın, R. ve Karatepe, A. G., “Kemiğin Biyomekanik Özellikleri ve Yaş ile İlişkili Kırıkların Biyomekaniği”, *Osteoporoz Dünyasından*, sayı 13, ss. 44–48, 2007.
- [25] Carter, D. ve Hayes, W., “Bone compressive strength: the influence of density and strain rate”, *Science*, c. 194, sayı 4270, ss. 1174–1176, 1976.
- [26] Jones, J. R. ve Hench, L. L., “Regeneration of trabecular bone using porous ceramics”, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, c. 7, sayı 4–5, ss. 301–307, Ağu. 2003.
- [27] Allori, A. C., Sailon, A. M., ve Warren, S. M., “Biological Basis of Bone Formation, Remodeling, and Repair—Part I: Biochemical Signaling Molecules”, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, c. 14, sayı 3, ss. 259–273, 2008.
- [28] Baykan, E., “Sert Doku Onarımı İçin Üç-Boyutlu Polimer-Biyoseramik Yapıların Geliştirilmesi Ve Hücre Kültürlerinde Kullanımı”, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı (Doktora Tezi),

2015.

- [29] Ülker, N., “Işık-Etkili Kemik Doku Mühendisliği”, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, (Yüksek Lisans Tezi), 2013.
- [30] Takezawa, T., “A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behavior”, *Biomaterials*, c. 24, sayı 13, ss. 2267–2275, 2003.
- [31] Lu, J. X., Flautre, B., Anselme, K., Hardouin, P., Gallur, A., Descamps, M., ve Thierry, B., “Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, c. 10, sayı 2, ss. 111–120, 1999.
- [32] Freyman, T. M., Yannas, I. V., ve Gibson, L. J., “Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering”, *Progress in Materials Science*, c. 46, sayı 3–4, ss. 273–282, 2001.
- [33] Okii, N., Nishimura, S., Kurisu, K., Takeshima, Y., ve Uozumi, T., “In vivo histological changes occurring in hydroxyapatite cranial reconstruction--case report.”, *Neurologia medico-chirurgica*, c. 41, sayı 2, ss. 100–4, 2001.
- [34] Hench, L. L., “Sol-gel materials for bioceramic applications”, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, c. 2, sayı 5, ss. 604–610, 1997.
- [35] Kuboki, Y., Takita, H., Kobayashi, D., Tsuruga, E., Inoue, M., Murata, M., Nagai, N., Dohi, Y., ve Ohgushi, H., “BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis”, *Journal of Biomedical Materials Research*, c. 39, sayı 2, ss. 190–199, 1998.
- [36] Yuan, H., Kurashina, K., De Bruijn, J. D., Li, Y., De Groot, K., ve Zhang, X., “A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics”, *Biomaterials*, c. 20, sayı 19, ss. 1799–1806, 1999.
- [37] Karageorgiou, V. ve Kaplan, D., “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis”, *Biomaterials*, c. 26, sayı 27, ss. 5474–5491, Eyl. 2005.

- [38] Kükürtcü, B., “Biyoaktif Cam Ve Cam-seramik Malzemelerin Üretimi Ve Yapay Vücut Sıvısı İçerisindeki Davranımlarının İncelenmesi”, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, (Yüksek Lisans Tezi), 2008.
- [39] Hubbell, J. A., “Biomaterials in tissue engineering”, *Bio/Technology*, c. 13, sayı 6, ss. 565–576, 1995.
- [40] Ma, P. X. ve Zhang, R., “Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix”, *Journal of Biomedical Materials Research*, c. 46, sayı 1, ss. 60–72, 1999.
- [41] Gür, A. K. ve Taşkın, M., “Metalik Biyomalzemeler ve Biyouyum”, *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, c. 2, sayı 2, ss. 106–113, 2004.
- [42] Menemşe Gümüşderelioğlu, “Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji”, *Bilim ve Teknik-Yeni Ufuklar*, c. Ekim, 2007.
- [43] Özarpat, Ö., “Stronsiyum Katkılı Biyoaktif Cam Malzeme Üretimi”, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği (Yüksek Lisans Tezi), 2011.
- [44] Mansur, H. S. ve Costa, H. S., “Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications”, *Chemical Engineering Journal*, c. 137, sayı 1, ss. 72–83, Mar. 2008.
- [45] Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., ve Boccaccini, A. R., “Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, c. 27, sayı 18. ss. 3413–3431, 2006.
- [46] Kohn, J. ve Langer, R., “Bioresorbable and bioerodible materials”, içinde *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, 1996, ss. 64–72.
- [47] Mano, J. F., Sousa, R. A., Boesel, L. F., Neves, N. M., ve Reis, R. L., “Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: State of the art and recent developments”, *Composites*

Science and Technology, c. 64, sayı 6, ss. 789–817, 2004.

- [48] B.L. Seala, T.C. Oterob, ve A. Panitch, “Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration”, *Materials Science and Engineering*, c. 34, sayı 4–5, ss. 147–230, 2001.
- [49] Karagöz A., “Misel oluşturabilen, biyouyumlu, biyobozunur, pozitif yüklü polimerik malzemelerin sentezi ve karakterizasyonu”, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi), 2009.
- [50] Lowry, K. J., Hamson, K. R., Bear, L., Peng, Y. B., Calaluce, R., Evans, M. L., Anglen, J. O., ve Allen, W. C., “Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model”, *Journal of Biomedical Materials Research*, c. 36, sayı 4, ss. 536–541, 1997.
- [51] Hutmacher, D. W., “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage”, *Biomaterials*, c. 21, sayı 24, ss. 2529–2543, 2000.
- [52] Woodruff, M. A. ve Hutmacher, D. W., “The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century”, *Progress in Polymer Science*, c. 35, sayı 10, ss. 1217–1256, Eki. 2010.
- [53] Cao, W. ve Hench, L. L., “Bioactive materials”, *Ceramics International*, c. 22, sayı 6, ss. 493–507, 1996.
- [54] Hench, L. L., “Biomaterials: A forecast for the future”, içinde *Biomaterials*, 1998, c. 19, sayı 16, ss. 1419–1423.
- [55] Hench, L. L., “Bioceramics”, *Journal of the American Ceramic Society*, c. 81, sayı 7, ss. 1705–1728, 1998.
- [56] Kokubo, T., *Bioceramics and their clinical applications*, c. XXXIII, sayı 2. 2012.
- [57] Sedel, L. ve Rey, C., *Bioceramics, Volume 10*, c. 10, sayı October. Paris: Pergamon, 1997.

- [58] Rahaman, M. N., Day, D. E., Sonny Bal, B., Fu, Q., Jung, S. B., Bonewald, L. F., ve Tomsia, A. P., “Bioactive glass in tissue engineering”, *Acta Biomaterialia*, c. 7, sayı 6, ss. 2355–2373, 2011.
- [59] Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M. N., ve Tomsia, A. P., “Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and future perspectives”, *Materials Science and Engineering C*, c. 31, sayı 7, ss. 1245–1256, 2011.
- [60] Fu, Q., Rahaman, M. N., Sonny Bal, B., Brown, R. F., ve Day, D. E., “Mechanical and in vitro performance of 13-93 bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication technique”, *Acta Biomaterialia*, c. 4, sayı 6, ss. 1854–1864, 2008.
- [61] Brown, R. F., Day, D. E., Day, T. E., Jung, S., Rahaman, M. N., ve Fu, Q., “Growth and differentiation of osteoblastic cells on 13-93 bioactive glass fibers and scaffolds”, *Acta Biomaterialia*, c. 4, sayı 2, ss. 387–396, 2008.
- [62] Fu, Q., Rahaman, M. N., Bal, B. S., Kuroki, K., ve Brown, R. F., “In vivo evaluation of 13-93 bioactive glass scaffolds with trabecular and oriented microstructures in a subcutaneous rat implantation model”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, c. 95, sayı 1, ss. 235–244, 2010.
- [63] Hoppe, A., Brandl, A., Bleiziffer, O., Arkudas, A., Horch, R. E., Jokic, B., Janackovic, D., ve Boccaccini, A. R., “In vitro cell response to Co-containing 1393 bioactive glass”, *Materials Science and Engineering C*, c. 57, ss. 157–163, 2015.
- [64] Hamadouche, M., Meunier, A., Greenspan, D. C., Blanchat, C., Zhong, J. P., La Torre, G. P., ve Sedel, L., “Long-term in vivo bioactivity and degradability of bulk sol-gel bioactive glasses”, *Journal of Biomedical Materials Research*, c. 54, sayı 4, ss. 560–566, 2001.
- [65] Fu, Q., Rahaman, M. N., Bal, B. S., Bonewald, L. F., Kuroki, K., ve Brown, R. F., “Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. II. In vitro and in vivo biological evaluation”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, c. 95A, sayı 1, ss. 172–179, Eki. 2010.

- [66] Huang, W., Day, D. E., Kittiratanapiboon, K., ve Rahaman, M. N., “Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, c. 17, sayı 7, ss. 583–596, 2006.
- [67] Liang, W., Rahaman, M. N., Day, D. E., Marion, N. W., Riley, G. C., ve Mao, J. J., “Bioactive borate glass scaffold for bone tissue engineering”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, c. 354, sayı 15–16, ss. 1690–1696, 2008.
- [68] Yao, A., Wang, D., Huang, W., Fu, Q., Rahaman, M. N., ve Day, D. E., “In Vitro Bioactive Characteristics of Borate-Based Glasses with Controllable Degradation Behavior”, *Journal of the American Ceramic Society*, c. 90, sayı 1, ss. 303–306, 2007.
- [69] Marion, N. W., Liang, W., Liang, W., Reilly, G. C., Day, D. E., Rahaman, M. N., ve Mao, J. J., “Borate Glass Supports the In Vitro Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells”, *Mechanics of Advanced Materials and Structures*, c. 12, sayı 3, ss. 239–246, May. 2005.
- [70] Wen, L., Rüssel, C., Day, D. E., ve Völksch, G., “Bioactive comparison of a borate, phosphate and silicate glass”, *Journal of Materials Research*, c. 21, sayı 1, ss. 125–131, 2006.
- [71] Bi, L., Rahaman, M. N., Day, D. E., Brown, Z., Samujh, C., Liu, X., Mohammadkhah, A., Dusevich, V., Eick, J. D., ve Bonewald, L. F., “Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model”, *Acta Biomaterialia*, c. 9, sayı 8, ss. 8015–8026, Ağu. 2013.
- [72] Liu, X., Pan, H., Fu, H., Fu, Q., Rahaman, M. N., ve Huang, W., “Conversion of borate-based glass scaffold to hydroxyapatite in a dilute phosphate solution”, *Biomedical Materials*, c. 5, sayı 1, s. 15005, Şub. 2010.
- [73] Bi, L., Jung, S., Day, D., Neidig, K., Dusevich, V., Eick, D., ve Bonewald, L., “Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, c. 100 A, sayı

12, ss. 3267–3275, 2012.

- [74] Geim, A. K. ve Novoselov, K. S., “The rise of graphene”, *Nature Materials*, c. 6, sayı 3, ss. 183–191, 2007.
- [75] Novoselov, K. S., “Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films”, *Science*, c. 306, sayı 5696, ss. 666–669, 2004.
- [76] Novoselov, K. S., Jiang, D., Schedin, F., Booth, T. J., Khotkevich, V. V., Morozov, S. V., ve Geim, A. K., “Two-dimensional atomic crystals”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, c. 102, sayı 30, ss. 10451–10453, 2005.
- [77] Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Katsnelson, M. I., Grigorieva, I. V., Dubonos, S. V., ve Firsov, A. A., “Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene”, *Nature*, c. 438, sayı 7065, ss. 197–200, 2005.
- [78] Zhang, Y., Tan, Y.-W., Stormer, H. L., ve Kim, P., “Experimental observation of the quantum Hall effect and Berry’s phase in graphene”, *Nature*, c. 438, sayı 7065, ss. 201–204, 2005.
- [79] Boehm, H. P., Setton, R., ve Stumpp, E., “Nomenclature and terminology of graphite intercalation compounds (IUPAC Recommendations 1994)”, *Pure and Applied Chemistry*, c. 66, sayı 9, ss. 1893–1901, 1994.
- [80] Landau, L. ve Lifshitz, E., “Statistical Physics, Part 1”, *Physics Today*, s. 562, 1980.
- [81] Mermin, N. D., “Crystalline order in two dimensions”, *Physical Review*, c. 176, sayı 1, ss. 250–254, 1968.
- [82] Venables, J. A., Spiller, G. D. T., ve Hanbucken, M., “Nucleation and growth of thin films”, *Reports on Progress in Physics*, c. 47, sayı 4, ss. 399–459, 1984.
- [83] Partoens, B. ve Peeters, F. M., “From graphene to graphite: Electronic structure around the K point”, *Physical Review B - Condensed Matter and*

Materials Physics, c. 74, sayı 7, 2006.

- [84] Morozov, S. V., Novoselov, K. S., Schedin, F., Jiang, D., Firsov, A. A., ve Geim, A. K., “Two-dimensional electron and hole gases at the surface of graphite”, *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, c. 72, sayı 20, 2005.
- [85] Lee, C., Wei, X., Kysar, J. W., ve Hone, J., “Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene”, *Science*, c. 321, sayı 5887, ss. 385–388, 2008.
- [86] Bolotin, K. I., Sikes, K. J., Jiang, Z., Klima, M., Fudenberg, G., Hone, J., Kim, P., ve Stormer, H. L., “Ultrahigh electron mobility in suspended graphene”, *Solid State Communications*, c. 146, sayı 9–10, ss. 351–355, 2008.
- [87] Balandin, A. a, Ghosh, S., Bao, W., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Miao, F., ve Lau, C. N., “Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene”, *Nano Letters*, c. 8, sayı 3, ss. 902–907, Mar. 2008.
- [88] Stoller, M. D., Park, S., Yanwu, Z., An, J., ve Ruoff, R. S., “Graphene-Based ultracapacitors”, *Nano Letters*, c. 8, sayı 10, ss. 3498–3502, 2008.
- [89] Lang, B., “A LEED study of the deposition of carbon on platinum crystal surfaces”, *Surface Science*, c. 53, sayı 1, ss. 317–329, 1975.
- [90] Bonaccorso, F., Lombardo, A., Hasan, T., Sun, Z., Colombo, L., ve Ferrari, A. C., “Production and processing of graphene and 2d crystals”, *Materials Today*, c. 15, sayı 12, ss. 564–589, 2012.
- [91] Berger, C., Wu, X., Brown, N., Naud, C., Li, X., Song, Z., Mayou, D., Li, T., Hass, J., Marchenkov, A., Conrad, E. H., First, P. N., ve De Heer, W. a., “Electronic Confinement and Coherence in Patterned Epitaxial Graphene”, *Science*, c. 312, sayı May, ss. 1191–1196, 2006.
- [92] Aizawa, T., Souda, R., Otani, S., ve Ishizawa, Y., “Anomalous Bond of Monolayer Graphite on Transition-Metal Carbide Surfaces”, *Physical Review Letters*, c. 64, sayı 7, ss. 768–771, 1990.

- [93] Viculis, L. M., “A Chemical Route to Carbon Nanoscrolls”, *Science*, c. 299, sayı 5611, ss. 1361–1361, 2003.
- [94] Somani, P. R., Somani, S. P., ve Umeno, M., “Planer nano-graphenes from camphor by CVD”, *Chemical Physics Letters*, c. 430, sayı 1–3, ss. 56–59, 2006.
- [95] Choi, W., Lahiri, I., Seelaboyina, R., ve Kang, Y. S., “Synthesis of graphene and its applications: A review”, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, c. 35, sayı 1, ss. 52–71, 2010.
- [96] Staudenmaier, L., “Verfahren zur darstellung der graphitsäure”, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, c. 31, sayı 2, ss. 1481–1487, 1898.
- [97] Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., ve Ruoff, R. S., “The chemistry of graphene oxide”, *Chem. Soc. Rev.*, c. 39, sayı 1, ss. 228–240, 2010.
- [98] Hummers, W. S. ve Offeman, R. E., “Preparation of Graphitic Oxide”, *Journal of the American Chemical Society*, c. 80, sayı 6, s. 1339, 1958.
- [99] Park, S. ve Ruoff, R. S., “Chemical methods for the production of graphenes”, *Nature Nanotechnology*, c. 4, sayı 4, ss. 217–224, 2009.
- [100] Latil, S. ve Henrard, L., “Charge carriers in few-layer graphene films”, *Physical Review Letters*, c. 97, sayı 3, ss. 1–4, 2006.
- [101] Zhang, K., Zhang, L. L., Zhao, X. S., ve Wu, J., “Graphene/polyaniline nanofiber composites as supercapacitor electrodes”, *Chemistry of Materials*, c. 22, sayı 4, ss. 1392–1401, 2010.
- [102] Rao, C. N. R., Sood, A. K., Subrahmanyam, K. S., ve Govindaraj, A., “Graphene: The new two-dimensional nanomaterial”, *Angewandte Chemie - International Edition*, c. 48, sayı 42, ss. 7752–7777, 2009.
- [103] Zhang, B., Wang, Y., ve Zhai, G., “Biomedical applications of the graphene-based materials”, *Materials Science and Engineering C*, c. 61, ss. 953–964, 2016.

- [104] Liu, Y., Dong, X., ve Chen, P., “Biological and chemical sensors based on graphene materials”, *Chem. Soc. Rev.*, c. 41, sayı 6, ss. 2283–2307, 2012.
- [105] Yang, Y., Asiri, A. M., Tang, Z., Du, D., ve Lin, Y., “Graphene based materials for biomedical applications”, *Materials Today*, c. 16, sayı 10. Elsevier Ltd., ss. 365–373, 2013.
- [106] Zhou, M., Zhai, Y., ve Dong, S., “Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide”, *Analytical Chemistry*, c. 81, sayı 14, ss. 5603–5613, 2009.
- [107] Shao, Y., Zhang, S., Engelhard, M. H., Li, G., Shao, G., Wang, Y., Liu, J., Aksay, I. A., ve Lin, Y., “Nitrogen-doped graphene and its electrochemical applications”, *Journal of Materials Chemistry*, c. 20, sayı 35, s. 7491, 2010.
- [108] Liu, Z., Robinson, J. T., Sun, X., ve Dai, H., “PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs”, *Journal of the American Chemical Society*, c. 130, sayı 33, ss. 10876–10877, 2008.
- [109] Sun, X., Zhang, Y., Zhang, X., Yu, J., Li, Y., Yang, X., Dai, Z., ve Li, M., “The clinical evaluation of Iressa first-line treatment of senium advanced-stage non-small cell lung cancer”, *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, c. 7, sayı 4, ss. 203–206, 2008.
- [110] Zhang, L. ve Dong, J., “A Soi-Mems-Based Single Axis Active Probe For Cellular Force Sensing And Cell Manipulation”, içinde *Proceedings of the ASME 2010 International Mechanical Engineering Congress & Exposition*, 2010, ss. 1–6.
- [111] Zhang, W., Guo, Z., Huang, D., Liu, Z., Guo, X., ve Zhong, H., “Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide”, *Biomaterials*, c. 32, sayı 33, ss. 8555–8561, 2011.
- [112] Yang, K., Hu, L., Ma, X., Ye, S., Cheng, L., Shi, X., Li, C., Li, Y., ve Liu, Z., “Multimodal imaging guided photothermal therapy using functionalized graphene nanosheets anchored with magnetic nanoparticles”, *Advanced Materials*, c. 24, sayı 14, ss. 1868–1872, 2012.

- [113] Chen, Q., Roether, J., ve Boccaccini, A., “Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials”, *Topics in Tissue Engineering*, c. 4, sayı 6, ss. 1–27, 2008.
- [114] Li, W., Fries, D. P., ve Malik, A., “Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography”, *Journal of Chromatography A*, c. 1044, sayı 1–2. ss. 23–52, 2004.
- [115] Toygun, Ş., Köneçoğlu, G., ve Kalpaklı, Y., “General Principles of Sol-Gel”, *Sigma, Journal of Engineering and Natural Sciences*, c. 31, ss. 456–46, 2013.
- [116] Jones, J. R. ve Hench, L. L., “Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering.”, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, c. 68, sayı Figure 1, ss. 36–44, 2004.
- [117] Jones, J. R., Ahir, S., ve Hench, L. L., “Large-scale production of 3D bioactive glass macroporous scaffolds for tissue engineering”, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, c. 29, sayı 3, ss. 179–188, 2004.
- [118] Sepulveda, P., Jones, J. R., ve Hench, L. L., “Bioactive sol-gel foams for tissue repair”, *Journal of Biomedical Materials Research*, c. 59, sayı 2, ss. 340–348, 2002.
- [119] Gough, J. E., Jones, J. R., ve Hench, L. L., “Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold”, *Biomaterials*, c. 25, sayı 11, ss. 2039–2046, 2004.
- [120] Kang, H. W., Tabata, Y., ve Ikada, Y., “Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering.”, *Biomaterials*, c. 20, sayı 14, ss. 1339–1344, 1999.
- [121] Deville, S., Saiz, E., ve Tomsia, A. P., “Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, c. 27, sayı 32, ss. 5480–5489, 2006.
- [122] Deville, S., “Freeze-casting of porous ceramics: A review of current achievements and issues”, *Advanced Engineering Materials*, c. 10, sayı 3, ss.

155–169, 2008.

- [123] Fukasawa, T., Deng, Z. Y., Ando, M., Ohji, T., ve Goto, Y., “Pore structure of porous ceramics synthesized from water-based slurry by freeze-dry process”, *Journal of Materials Science*, c. 36, sayı 10, ss. 2523–2527, 2001.
- [124] Fu, Q., Rahaman, M. N., Dogan, F., ve Bal, B. S., “Freeze casting of porous hydroxyapatite scaffolds. I. Processing and general microstructure”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, c. 86, sayı 1, ss. 125–135, 2008.
- [125] Nishihara, H., Mukai, S. R., Yamashita, D., ve Tamon, H., “Ordered macroporous silica by ice templating”, *Chemistry of Materials*, c. 17, sayı 3, ss. 683–689, 2005.
- [126] Ren, L., Zeng, Y. P., ve Jiang, D., “Fabrication of gradient pore TiO₂ sheets by a novel freeze-tape-casting process”, *Journal of the American Ceramic Society*, c. 90, sayı 9, ss. 3001–3004, 2007.
- [127] Song, J. H., Koh, Y. H., Kim, H. E., Li, L. H., ve Bahn, H. J., “Fabrication of a porous bioactive glass-ceramic using room-temperature freeze casting”, *Journal of the American Ceramic Society*, c. 89, sayı 8, ss. 2649–2653, 2006.
- [128] Ramay, H. R. ve Zhang, M., “Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods”, *Biomaterials*, c. 24, sayı 19, ss. 3293–3302, 2003.
- [129] Sepulveda, P., Binner, J. G. P., Rogero, S. O., Higa, O. Z., ve Bressiani, J. C., “Production of porous hydroxyapatite by the gel-casting of foams and cytotoxic evaluation”, *Journal of Biomedical Materials Research*, c. 50, sayı 1, ss. 27–34, 2000.
- [130] Yang, J., Yu, J., ve Huang, Y., “Recent developments in gelcasting of ceramics”, *Journal of the European Ceramic Society*, c. 31, sayı 14, ss. 2569–2591, 2011.
- [131] Leong, K. F., Cheah, C. M., ve Chua, C. K., “Solid freeform fabrication of

- three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs”, *Biomaterials*, c. 24, sayı 13, ss. 2363–2378, 2003.
- [132] Apak, S., “Farklı Hızlı Prototipleme Cihazlarında Üretilen Parçaların Üretim Zamanı ve Maliyet Açısından Karşılaştırılması”, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi), 2010.
- [133] Meng, D., Ioannou, J., ve Boccaccini, A. R., “Bioglass based scaffolds with carbon nanotube coating for bone tissue engineering”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, c. 20, sayı 10, ss. 2139–2144, 2009.
- [134] Porwal, H., Estili, M., Grünewald, A., Grasso, S., Detsch, R., Hu, C., Sakka, Y., Boccaccini, A. R., ve Reece, M. J., “45S5 Bioglass[®]–MWCNT composite: processing and bioactivity”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, c. 26, sayı 6, 2015.
- [135] Shih, S. J., Chen, C. Y., Lin, Y. C., Lee, J. C., ve Chung, R. J., “Investigation of bioactive and antibacterial effects of graphene oxide-doped bioactive glass”, *Advanced Powder Technology*, c. 27, sayı 3, ss. 1013–1020, 2016.
- [136] Li, Z., Khun, N. W., Tang, X. Z., Liu, E., ve Khor, K. A., “Mechanical, tribological and biological properties of novel 45S5 Bioglass[®] composites reinforced with in situ reduced graphene oxide”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, c. 65, ss. 77–89, 2017.
- [137] Kokubo, T. ve Takadama, H., “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?”, *Biomaterials*, c. 27, sayı 15, ss. 2907–2915, May. 2006.
- [138] Liu, X., Ding, C., ve Wang, Z., “Apatite formed on the surface of plasma-sprayed wollastonite coating immersed in simulated body fluid”, *Biomaterials*, c. 22, sayı 14, ss. 2007–2012, 2001.
- [139] Kang, R., Zhou, Y., Tan, S., Zhou, G., Aagaard, L., Xie, L., Bünker, C., Bolund, L., ve Luo, Y., “Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity”, *Stem Cell Research & Therapy*, c. 6, sayı 1, s. 144, 2015.

- [140] Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M., ve Glasebrook, A. L., “An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT”, *Journal of Immunological Methods*, c. 142, sayı 2, ss. 257–265, 1991.
- [141] Xiu Ming Wang, Terasaki, P. I., Rankin, G. W., Chia, D., Hui Ping Zhong, ve Hardy, S., “A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release”, *Human Immunology*, c. 37, sayı 4, ss. 264–270, 1993.
- [142] Nan, H. Y., Ni, Z. H., Wang, J., Zafar, Z., Shi, Z. X., ve Wang, Y. Y., “The thermal stability of graphene in air investigated by Raman spectroscopy”, *Journal of Raman Spectroscopy*, c. 44, sayı 7, ss. 1018–1021, 2013.
- [143] Fan, Y., Jiang, W., ve Kawasaki, A., “Highly conductive few-layer graphene/Al₂O₃ nanocomposites with tunable charge carrier type”, *Advanced Functional Materials*, c. 22, sayı 18, ss. 3882–3889, 2012.
- [144] Zhou, T. N., Qi, X. D., ve Fu, Q., “The preparation of the poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites with low percolation threshold and high electrical conductivity by using the large-area reduced graphene oxide sheets”, *Express Polymer Letters*, c. 7, sayı 9, ss. 747–755, 2013.
- [145] Michálková, M., Kašiarová, M., Tatarko, P., Dusza, J., ve Šajgalík, P., “Effect of homogenization treatment on the fracture behaviour of silicon nitride/graphene nanoplatelets composites”, *Journal of the European Ceramic Society*, c. 34, sayı 14, ss. 3291–3299, 2014.
- [146] Chen, Y. F., Bi, J. Q., Yin, C. L., ve You, G. L., “Microstructure and fracture toughness of graphene nanosheets/alumina composites”, *Ceramics International*, c. 40, sayı 9 PART A, ss. 13883–13889, 2014.
- [147] Fu, H., Fu, Q., Zhou, N., Huang, W., Rahaman, M. N., Wang, D., ve Liu, X., “In vitro evaluation of borate-based bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication method”, *Materials Science and Engineering C*, c. 29, sayı 7, ss. 2275–2281, 2009.
- [148] Ohtsuki, C., Kokubo, T., ve Yamamuro, T., “Mechanism of apatite formation

- on CaOSiO₂P₂O₅ glasses in a simulated body fluid”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, c. 143, ss. 84–92, 1992.
- [149] Eqtesadi, S., Motealleh, A., Wendelbo, R., Ortiz, A. L., ve Miranda, P., “Reinforcement with reduced graphene oxide of bioactive glass scaffolds fabricated by robocasting”, *Journal of the European Ceramic Society*, c. 37, sayı 12, ss. 3695–3704, 2017.
- [150] Fu, Q., Rahaman, M. N., Fu, H., ve Liu, X., “Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. I. Preparation and in vitro degradation”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, c. 95, sayı 1, ss. 164–171, 2010.
- [151] Deliormanlı, A. M., “Fabrication and characterization of poly(ϵ -caprolactone) coated silicate and borate-based bioactive glass composite scaffolds”, *Journal of Composite Materials*, c. 50, sayı 7, ss. 917–928, 2016.
- [152] Turk, M. ve Deliormanlı, A. M., “Electrically conductive borate-based bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering applications”, *Journal of Biomaterials Applications*, c. 32, sayı 1, ss. 28–39, 2017.
- [153] Vallet-Regí, M., Romero, A. M., Ragel, C. V., ve LeGeros, R. Z., “XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses”, *Journal of Biomedical Materials Research*, c. 44, sayı 4, ss. 416–421, 1999.
- [154] Fragale, A., Tartaglia, M., Bernardini, S., Di Stasi, A. M. M., Di Rocco, C., Velardi, F., Teti, A., Battaglia, P. A., ve Migliaccio, S., “Decreased proliferation and altered differentiation in osteoblasts from genetically and clinically distinct craniosynostotic disorders”, *American Journal of Pathology*, c. 154, sayı 5, ss. 1465–1477, 1999.
- [155] Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., ve Yönden, Z., “Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri”, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, c. 6, sayı 3, ss. 331–336, 2015.
- [156] Golub, E. E. ve Boesze-Battaglia, K., “The role of alkaline phosphatase in

mineralization”, *Current Opinion in Orthopaedics*, c. 18, sayı 5, ss. 444–448, 2007.

- [157] Fritzsche, M. ve Mandenius, C. F., “Fluorescent cell-based sensing approaches for toxicity testing”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, c. 398, sayı 1, ss. 181–191, 2010.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mert TÜRK

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1991

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : mertturk@ogr.cbu.edu.tr, mertturk@hotmail.com,
mertturkk1@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : İzmir Atatürk Lisesi, 2009

Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Makine Mühendisliği
Bölümü, 2015

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Mühendislik Bilimleri Anabilim Dalı, Metalurji ve Malzeme
Mühendisliği Bölümü

Yayınları

1. Makaleler

1. Turk, M. ve Deliormanlı, A. M., “Electrically conductive borate-based bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering applications”, Journal of Biomaterials Applications, c. 32, sayı 1, ss. 28–39, 2017.

2. Bildiriler

1. Turk, M. ve Deliormanlı, A. M., “Graphene-containing borate based bioactive glass composite scaffolds for tissue engineering applications” 16th International Materials Symposium (IMSP'2016), 12-14 Ekim 2016, Denizli.
2. Turk, M. ve Deliormanlı, A. M., “Biological Response of MC3T3-E1 Cells to Graphene-containing PCL-coated Porous Silicate Bioactive Glass Scaffolds”, 22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu (BioMed'2017), 12-14 Mayıs 2017, Ankara.
3. Turk, M. ve Deliormanlı, A. M., “*In vitro* Response of Pre-Osteoblast Cells to Graphene /13-93B3 Borate- Based Bioactive Glass Scaffolds”, 22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu (BioMed'2017), 12-14 Mayıs 2017, Ankara.

4. Deliormanlı, A. M. ve Turk M., “Graphene and MWCNT-Containing Porous Hydroxyapatite Scaffolds For Bone Tissue Engineering Applicatons”, International Materials Technologies and Metallurgy Conference 2017 (MTM’2017), 26-27 Ekim 2017, İstanbul.
5. Deliormanlı, A. M. ve Turk, M., “Flow Behaviour of Injectable Pluronic F-127 Gels Containing Borate Based Bioactive Glass Particles”, International Materials Technologies and Metallurgy Conference 2017 (MTM’2017), 26-27 Ekim 2017, İstanbul.
6. Deliormanlı, A. M. ve Turk, M., “Direct Write Assembly of Graphene-containing Grid-like Bioactive Glass Scaffolds”, International Materials Technologies and Metallurgy Conference 2017 (MTM’2017), 26-27 Ekim 2017, İstanbul.

