

**YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN GRAFEN OKSİT/POLİMER  
KOMPOZİTLERİNİN HAZIRLANMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Emre TEKAY**

**Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Polimer Mühendisliği Programı**

**TEMMUZ 2014**



**YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN GRAFEN OKSİT/POLİMER  
KOMPOZİTLERİNİN HAZIRLANMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Emre TEKAY  
(125101002)**

**Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Polimer Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU**

**TEMMUZ 2014**



YALOVA Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün **125101002** numaralı Yüksek Lisans / Doktora Öğrencisi **Emre TEKAY**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN GRAFEN OKSİT/POLİMER KOMPOZİTLERİNİN HAZIRLANMASI”** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Doç. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU**  
Yalova Üniversitesi



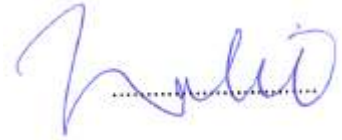
**Jüri Üyeleri :** **Doç. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU**  
Yalova Üniversitesi



**Doç. Dr. Sinan ŞEN**  
Yalova Üniversitesi



**Doç. Dr. Halil Murat AYDIN**  
Hacettepe Üniversitesi



**Teslim Tarihi** : **20 Haziran 2014**  
**Savunma Tarihi** : **07 Temmuz 2014**



*Şerefe,*





## ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışması, Yalova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Polimer Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Polimer Mühendisliği Programı 'nın desteği ile gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans programım süresince bilgi, deneyim ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli tez danışmanım Doç. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU 'na,

Tez çalışmam sürecinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Halil Murat AYDIN ve Doç. Dr. Sinan ŞEN 'e,

Bugünlere gelmemde emeği geçen aileme ve dostlarıma teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Temmuz 2014

Emre Tekay



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
KISALTMALAR .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY .....	xix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı.....	2
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
2.1. Kemik Dokusu .....	5
2.1.1. Organik Matriks .....	6
2.1.2. İnorganik Matriks.....	7
2.1.3. Kemik Hücreleri.....	7
2.1.3.1. Osteoprogenitörler .....	7
2.1.3.2. Osteoblastlar.....	8
2.1.3.3. Osteositler .....	9
2.1.3.4. Osteoklastlar.....	9
2.1.4. Kemik Tipleri .....	10
2.1.5. Kemik Onarımı .....	11
2.2. Doku Mühendisliği .....	12
2.3.1. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Temel Faktörler .....	13
2.3.2. Kemik Doku Mühendisliği.....	15
2.3.3. Sert Doku Onarım Malzemeleri .....	16
2.3.3.1. Greftler .....	16
2.3.3.1.1. Ototreft .....	16
2.3.3.1.2. Allogreft .....	17
2.3.3.1.3. Xenogreft.....	17
2.3.3.1.4. Diğer Greftler .....	18
2.4. Doku İskeleleri .....	18
2.4.1. Doku İskelelerinde Kullanılan Malzemeler .....	20
2.4.1.1. Doğal Polimerler .....	20
2.4.1.1.1. Kollajen.....	20
2.4.1.1.2. Kitosan .....	21
2.4.1.1.3. Glikozaminglikan.....	21
2.4.1.1.4. İpek Fibroin.....	22
2.4.1.1.5. Agaroz.....	22
2.4.1.1.6. Aljinat.....	23
2.4.1.2. Sentetik Polimerler.....	23
2.4.1.2.1. Poli(glikolik asit), Poli(laktik asit) ve Kopolimerleri .....	23
2.4.1.2.2. Polidioksanon (PDS).....	25
2.4.1.2.3. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) .....	26
2.4.1.2.4. Poliüretanlar .....	26
2.4.1.2.5. Poli (orto-Ester).....	27
2.4.1.2.6. Polianhidritler.....	27
2.4.1.3. Seramikler .....	28

2.4.1.4. Grafen.....	29
2.4.1.4.1. Grafen Oksit.....	31
2.4.2. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri.....	33
2.4.2.1. Çözücü Dökme.....	33
2.4.2.2. Partikül Uzaklaştırma.....	33
2.4.2.3. Gaz Köpürtme.....	34
2.4.2.4. Faz Ayrımı.....	35
2.4.2.5. Elektro-eğirme.....	35
2.4.2.6. Dondurarak Kurutma.....	36
2.4.2.7. Eriyik Bazlı Teknolojiler.....	36
2.4.2.8. Fiber Bağlama.....	36
2.4.2.9. Hızlı Prototipleme.....	37
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>39</b>
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	39
3.2. GO/Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması.....	39
3.2.1. GO-HF/Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması.....	39
3.2.2. Liyofilize GO/Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması.....	39
3.2.3. Gözenekli Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	40
3.3. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	41
3.3.1. Doku iskelelerinin morfolojisi.....	41
3.3.1.1. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Micro-CT).....	41
3.3.1.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	41
3.3.2. Fiziksel Yapı ve Kristalinite.....	41
3.3.2.1. X-Işını Difraksiyonu (XRD).....	41
3.3.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC).....	41
3.3.2.3. Mekanik Testler.....	41
<b>4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>43</b>
4.1. Doku iskelelerinin morfolojisi.....	44
4.1.1. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Micro-CT).....	44
4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	47
4.2. Fiziksel Yapı ve Kristalinite.....	51
4.2.1. X-Işını Difraksiyonu (XRD).....	51
4.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC).....	53
4.2.3. Basma Testi.....	56
<b>5. SONUÇLAR.....</b>	<b>59</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>61</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>77</b>

## KISALTMALAR

<b>GO</b>	: Grafen Oksit
<b>PLLA</b>	: Poli(L-Laktik Asit)
<b>PCL</b>	: Poli( $\epsilon$ -Kaprolakton)
<b>ECM</b>	: Ekstraselüler Matriks
<b>HA</b>	: Hidroksi Apatit
<b>GAG</b>	: Glikozaminglikan
<b>PGA</b>	: Poli(Glikolik Asit)
<b>PDLA</b>	: Poli(D-Laktik Asit)
<b>PDLLA</b>	: Poli(D,L-Laktik Asit)
<b>PDS</b>	: Polidioksan
<b>PU</b>	: Poliüretan
<b><math>\beta</math>-TCP</b>	: $\beta$ -trikalsiyum fosfat
<b>AFM</b>	: Atomik Kuvvet Mikroskopu
<b>HFIP</b>	: 1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-Propanol
<b>HF</b>	: HFIP ile üretilmiş
<b>FD</b>	: Liyofilize grafen oksit içeren
<b>FD</b>	: Dondurarak Kurutma
<b>Micro-CT</b>	: Mikro-Bilgisayarlı Tomografi
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskopu
<b>XRD</b>	: X-Işını Difraksiyonu
<b>DSC</b>	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 4.1</b> : FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin termal özellikleri.....	54
<b>Çizelge 4.2</b> : HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin termal özellikleri.....	55
<b>Çizelge 4.3</b> : FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin basma test değerleri ...	57
<b>Çizelge 4.4</b> : HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin basma test değerleri ...	58





## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Kemiğin genel yapısı.....	5
Şekil 2.2 : Kemik hücreleri.....	7
Şekil 2.3 : Kompakt ve süngerimsi kemiğin şematik görünümü.....	10
Şekil 2.4 : Doku mühendisliği prosesi.....	14
Şekil 2.5 : Laktat stereoizomerleri ve PLA 'in halka açılma polimerizasyonu .....	25
Şekil 2.6 : PCL 'un halka açılması polimerizasyonu .....	26
Şekil 2.7 : Grafen ve grafitik formlar.....	30
Şekil 2.8 : Hummers metodu ile GO sentezi.....	32
Şekil 4.1 : Liyofilize grafen oksit ile desteklenmiş PLLA/PCL doku iskelelerinin mikro-CT görüntüleri .....	45
Şekil 4.2 : HPIF ekstrakte grafen oksit ile desteklenmiş PLLA/PCL doku iskelelerinin mikro-CT görüntüleri. ....	45
Şekil 4.3 : Doku iskelelerinin mikro-CT ile ölçülen ortalama gözeneklilik oranı ve gözenekler arası bağlantı yüzdesi.....	46
Şekil 4.4 : Doku iskelelerinin mikro-CT ile ölçülen ortalama gözenek boyutu ve ortalama gözenek duvar kalınlıkları .....	47
Şekil 4.5 : Grafen Oksite ait SEM görüntüleri .....	48
Şekil 4.6 : FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelesi SEM görüntüleri .....	49
Şekil 4.7 : HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelesi SEM görüntüleri .....	50
Şekil 4.8 : FD ve HF metodları ile hazırlanmış doku iskelesi SEM görüntüleri.....	50
Şekil 4.9 : Grafen oksitin XRD spektrumları .....	52
Şekil 4.10 : Değişik oranda GO-HF içeren doku iskelelerinin XRD spektrumları ...	53
Şekil 4.11 : FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerine ait DSC ısıtma grafiği .....	53
Şekil 4.12 : FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerine ait DSC soğutma grafiği... ..	54
Şekil 4.13 : HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerine ait DSC ısıtma grafiği.....	55
Şekil 4.14 : HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerine ait DSC soğutma grafiği... ..	55
Şekil 4.15 : FD yöntemiyle hazırlanmış doku iskelesi basma testi grafiği.....	56
Şekil 4.16 : HF yöntemiyle hazırlanmış doku iskelesi basma testi grafiği.....	57



## BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN GRAFEN OKSİT/POLİMER KOMPOZİTLERİNİN HAZIRLANMASI

### ÖZET

Kemik dokusu kendini onarma yeteneğine sahip olsa da yaralanma ya da hastalık sonucu ortaya çıkan büyük kemik hasarlarının tedavisi mümkün olmamaktadır. Geleneksel biyolojik greftlere alternatif bir çözüm olan kemik doku mühendisliği yaklaşımında, hasarlı dokunun yenilenmesi sürecinde görev alan hücrelerin çoğalabilmesi için gerekli mekanik ve biyolojik desteği sağlayan biyobozunur polimerlerden üretilen doku iskeleleri kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, grafen oksit ile takviye edilmiş, poli(L-laktik asit) (PLLA)/poli(ε-kaprolakton) (PCL) karışımı kullanılarak gözenekli biyobozunur kemik doku iskeleleri hazırlandı. Polimer faz içerisindeki PLLA / PCL oranı, bozunma hızları ve mekanik özellikleri göz önünde bulundurularak 50/50 (w/w) olarak seçildi. Gözenekli yapının elde edilmesi için sırasıyla partikül uzaklaştırma ve süperkritik karbondioksit yöntemleri uygulandı. Gözenek boyutunu kontrol altında tutmak için 150-250 µm çapında sodyum klorür kristalleri kullanıldı. Grafen oksitin polimer faz içerisinde homojen olarak dağıtılmasını sağlamak amacıyla iki farklı yöntem ve çözücüden yararlanıldı. İlk yöntemde grafen oksit, plakalarının açılması için liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu ve doku iskelelerinin üretimi için çözücü olarak kloroform kullanıldı. İkinci yöntemde ise grafen oksit 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP) çözücüsü içerisinde dağıtıldıktan sonra doku iskeleleri üretildi. Her iki yöntemle %2-5-7 (w/w) oranında grafen oksit içeren doku iskeleleri hazırlandı ve bu doku iskelelerinin özellikleri grafen oksit içermeyen doku iskeleleri ile karşılaştırıldı. Doku iskelelerinin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve mikro bilgisayarlı tomografi (micro-CT) ile incelendi. Elde edilen sonuçlar doku iskelelerinin yüksek porozite ve gözenekler arası bağlantılara sahip olduğunu gösterdi. Grafen oksitin polimer faza ait kristallik özelliklerine etkisi X-ışını difraksiyonu (XRD) yöntemi ile incelendi ve grafen oksit miktarındaki artış ile polimer faza ait kristallik piklerinin şiddetinin arttığı gözlemlendi. Doku iskelelerinin termal özellikleri diferansiyel taramalı kalorimetre ile incelendi ve polimer fazın termal özelliklerinin grafen oksit miktarından bağımsız olduğu görüldü. Son olarak doku iskelelerine ait mekanik özellikler basma testi ile tayin edildi. Liyofilize grafen oksit ile hazırlanan doku iskelelerinde mekanik mukavemet grafen oksit miktarı ile ters orantılı değişirken, HFIP kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinin mekanik dayanımının grafen oksit miktarı ile arttığı gözlemlendi.



## **PREPARATION OF GRAPHENE / POLYMER COMPOSITES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

### **SUMMARY**

Although bone has its own ability to repair, the defects caused by injury or diseases could not be treated easily. As an alternative to the traditional biological grafts, bone tissue engineering approach uses scaffolds to provide required mechanical and biological supports to the cells that take place in tissue regeneration process. In this study, porous biodegradable bone scaffolds that are reinforced with graphene oxide were prepared by using a blend of poly(L-lactic acid)/poly( $\epsilon$ -caprolactone). The ratio of PLLA/PCL was selected as 50/50 (w/w) considering both degradation rates and mechanical properties of the polymers. In order to obtain porous structure, particle leaching and supercritical carbon dioxide methods were carried out. Sodium chloride crystals having diameter between 150-250  $\mu\text{m}$  were used to keep the pore size under control. Two different methods and two different solvents were utilized for the purpose of dispersing graphene oxide homogeneously in the polymeric phase. In the first method, to achieve exfoliated form, graphene oxide was subjected to lyophilization, and chloroform was used as solvent to fabricate the scaffolds. In the second method, initially graphene oxide was dispersed in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) and then the scaffolds were fabricated. 2-5-7 wt% of graphene oxide loaded scaffolds were prepared by each method and the properties of these scaffolds were compared to unloaded scaffolds. Morphological properties of the scaffolds were investigated by scanning electron microscopy (SEM) and micro-computed tomography (micro-CT). The results obtained showed that the scaffolds have high porosity and interconnectivity. The effect of graphene oxide on crystallinity of the polymer phase was characterized by X-ray diffraction (XRD) method, and from the XRD data it was seen that an increase in the amount of graphene oxide in the composite, increased the crystal peak intensities of the polymers. The thermal properties of the scaffold were examined by differential scanning calorimetry (DSC) and the results obtained showed that the thermal properties of the polymers are independent of graphene oxide amount in the composite. Finally, the mechanical properties of the scaffolds were investigated by an uniaxial compression test. It was seen that while the mechanical properties of the lyophilized graphene oxide loaded scaffolds decreased with graphene oxide amount, those increased for the scaffolds that were prepared by HFIP with increasing graphene oxide.



## 1. GİRİŞ

Günümüzde, hastalık ya da yaralanma sonucu oluşan doku kayıplarının tedavilerinde hayvanlardan temin edilen zenogreft veya insanlardan temin edilen allogreft gibi greftlerin implantasyonu mümkündür. Ancak implante edilen bu doku veya organların vücut tarafından reddedilme riski her zaman karşılaşılabilecek bir sorundur. Hastanın kendisinden temin edilen otopreftler bu problemi minimize etmektedir, ancak ikinci bir cerrahi operasyona gereksinim duyulması otopreftleri optimum çözüm olmaktan uzaklaştırır. Bu durumlarda doku mühendisliği otopreftlere alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır [1]. Doku mühendisliği yaklaşımında hastadan alınan hücrelerin in-vitro olarak bir doku iskelesi üzerinde çoğaltılması ile ihtiyaç duyulan doku üretilir ve üretilen bu doku hastaya implante edilir. Bu yeni yaklaşım sayesinde immün vücut reaksiyonları azaltılmış ve hastaya patojen geçişleri engellenmiş olur.

Ligamentler, kalp kapakçıkları, kan damarları, kırıkta, kemik ve diğer dokuların üretimi üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Kan damarlarından sonra en fazla implante edilen doku kemiktir. Dünya genelinde her yıl 2.2 milyon kemik grefti kemik hasar tedavilerinde kullanılmaktadır [2]. Bu durum kemik greftlerine duyulan ihtiyacı ve kemik dokusunun doku mühendisliği alanındaki önemini göstermektedir.

Kemik doku kayıplarının tedavileri ile ilgili yapılan birçok çalışmada, poli(laktik asit) (PLLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(glikolik asit) (PGA), poli( $\epsilon$ -kaprolakton) gibi FDA (Food and Drug Administration) onaylı biyobozunur sentetik polimerlerden üretilen gözenekli doku iskeleleri geliştirilmiş, hem in-vivo hem de in-vitro olarak incelenmiştir. İdeal bir doku iskelesi hasar bölgesindeki fizyolojik yüklenmeleri tolere etmeli, kemik oluşumunu desteklemeli ve kemik oluşumu sırasında degradasyona uğramalıdır [3].

Kemik dokusunun dizaynı osteoindüktif büyüme faktörleri, osteoblastik ya da osteoprogenitör hücreler ve osteokondüktif doku iskelesi arasında etkili ve verimli bir ilişki kurulmasını gerektirir. Osteokondüktif doku iskelesi mekanik destek

sağlamakla birlikte hücrelerin yapışması ve gelişmesi için bir platform görevi üstlenerek yeni oluşan dokuya rehberlik eder. Büyüme faktörleri hücrelerin hasarlı bölgede yapışma, büyüme ve farklılaşma gibi fonksiyonlarına yardım eder. Bir donörden veya otolog olarak temin edilen hücreler ise yeni dokunun oluşumundan doğrudan sorumludur [4-7]. Bu üç temel faktör ve bunların uygun şekilde kombine edilmeleri başarılı bir kemik doku mühendisliği uygulamasının temelini teşkil eder.

Üç boyutlu gözenekli yapıların elde edilmesi için partikül uzaklaştırma, faz ayrımı, tekstil teknolojileri gibi çeşitli üretim teknikleri kullanılmaktadır. Ancak mimari açıdan doğal ekstraselüler matriksin taklit edilmesi kolay değildir. Bu nedenle doku iskelelerinin fonksiyonlarını ve mimarisini geliştirmek için yeni dizayn ve üretim teknolojilerinin geliştirilmesi gerekmektedir [8,9].

Son zamanlarda, grafen ve GO biyolojik ve biyoteknik uygulamalarda dikkatleri üzerine çekmiştir. Bu uygulamalardan bazıları; doku iskeleleri, ilaç ve gen taşıma sistemleri, biyo-görüntüleme ve biyo-sensör malzemeleri ve sinir arayüzeleridir [10-12]. Grafen bal peteği şeklinde organize olmuş iki boyutlu karbon kristalidir. Grafen yüksek elektrik ve termal iletkenlik, olağanüstü mekanik mukavemet ve sertlik, iyi optik özellikler ve çok iyi kimyasal kararlılık gibi dikkat çekici özelliklere sahiptir [13, 14]. Grafen oksit (GO), grafenin kuvvetli oksitleyiciler kullanılarak sentezlenen en popüler modifiye halidir. GO, tabakalı bir yapıya sahip olsa da oksidasyon nedeniyle elektronik konjügasyonunu kaybetmiştir ve grafene göre daha açık renklidir [15, 16]. GO, oksijenli fonksiyonel grupları sayesinde polimer matriks, organik çözücüler ve su içerisinde kararlı şekilde dağıtılabılır [17, 18].

## **1.1 Tezin Amacı**

Bu çalışmada, kemik matriksinin organik ve inorganik yapısını taklit edebilecek, kemik rejenerasyonuna katkıda bulunacak grafen oksit/polimer nanokompozitlerin hazırlanması amaçlanmıştır.

Degradasyon hızları ve mekanik özellikleri göz önünde bulundurularak optimum oranda PLLA ve PCL polimerleri blend halinde kullanılarak doku iskelesinin matriksi oluşturulmaya çalışılmıştır. Nano dolgu olarak, keşfedildiği günden bu yana fiziksel ve kimyasal özellikleriyle dikkatleri üzerine çeken grafenin oksidasyonu ile elde edilen grafen oksit kullanılmıştır. GO kullanımıyla doku iskelesinin mekanik



mukavemeti arttırılarak osteokondüktif özelliklerinin ve doku rejenerasyonunu hızlandıracak osteoindüktif özelliklerinin artması beklenmiştir.

İdeal bir doku iskelesinin sahip olması gereken özelliklerin başında gelen gözenekli yapıyı elde etmek için doku iskelesi üretim yöntemlerinden biri olan partikül uzaklaştırma tekniği kullanılmış, doku yenilenmesinde hayati öneme sahip madde ve besin transferini olanaklı kılan gözenekler arası bağlantıların oluşturulması için süperkritik karbon dioksit tekniği uygulanmıştır.

Grafen oksit takviyeli gözenekli polimerik doku iskelelerinin morfolojik, termal ve mekanik özellikleri; içerdikleri grafen oksit miktarı, kullanılan yöntem ve kullanılan çözücünün birer fonksiyonu olarak incelenmiştir.

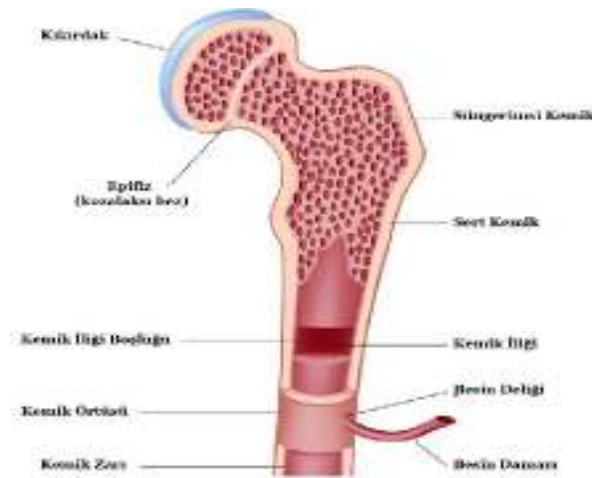


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kemik Dokusu

Kemik dinamik yapıya sahip bir dokudur. Kemik insan iskeletinin oluşum, büyüme, bakım, iyileşme ve yenilenme gibi ihtiyaçlarını yaşam süresince karşılar. Kemik, vücut içerisinde mekanik destek, kasların tutunması, iç organların korunması ve mineral depolama olmak üzere dört temel fonksiyona sahiptir. Bu fonksiyonları yerine getirebilmesi için kemik yaşam süresince devamlı olarak yıkılır ve tekrar oluşturulur [19-20].

Kemik, yaklaşık olarak %70 mineral matriks, %22 organik matriks ve %8 su içerir. Kemik mekanik yapısı bu bileşenler arasındaki etkileşimler tarafından belirlenir [21]. Makroskopik boyutta olgun bir kemik, kompakt (kortikal) kemik ve süngerimsi (trabeküler) kemik olmak üzere iki tip dokudan meydana gelir. Kompakt kemik sert ve yoğun bir yapıya sahiptir. Kemik dış yüzeyinde bulunur, görevi mekanik destek sağlamak ve kemiği korumaktır. Süngerimsi kemik kompakt kemiğe göre daha elastiktir ve oluşum hızı daha yüksektir [22]. Bir kemiğin %80'i kompakt kemikten ve %20'si süngerimsi kemikten meydana gelir [23]. Şekil 2.1 'de kemiğin genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.1: Kemiğin genel yapısı [24].

Mikroskopik boyutta ise kemik, kendine has fonsiyonlara sahip birkaç çeşit hücreden ve ekstraselüler matriksten (ECM) meydana gelir [25,26]. ECM, inorganik (kalsiyum fosfat nanokristalleri) ve organik (kollajen, elastin, polisakkaridler) bileşenlerden oluşan dinamik bir ağ yapısıdır. ECM bünyesinde bulundurduğu büyüme faktörleri ve sitokinler vasıtası ile hücre çoğalması ve değişimini düzenler. ECM'in organik fazı kollajen Tip-I, proteoglikanlar ve kollajen olmayan proteinleri içerir. Kemik matriksinin üçte ikisi kalsiyum fosfattan ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) oluşur. Kalsiyum fosfat, kalsiyum hidroksit ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) ile tepkimeye girerek hidroksi apatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) kristallerini oluşturur. Kemik matriksinin geriye kalan üçte birlik kısmı kollajenden oluşur. Kemik hücreleri toplam kemik kütleinin sadece %2'lik kısmını oluşturur [27]. Kemik matriksi iki fazlı bir sistemdir; mineral faz sertliği sağlarken, kollajen faz ise sünekliği ve enerji absorblanmasını (tokluk) sağlar [28].

### **2.1.1. Organik Matriks**

Kemik kütleinin yaklaşık %30'unu oluşturan organik matriks, fibröz proteinler ve kollajenden oluşur [29]. Organik matriks osteoid olarak da isimlendirilir. Osteoid, osteoblastlar tarafından salgılanan kalsifiye olmamış organik matrikstir ve %90 kollajen Tip-I içerir. Geriye kalan yapı ise kollajen olmayan proteinler, glikoproteinler, proteoglikanlar, peptitler, karbohidratlar ve lipitlerden oluşur [30,31].

Kollajen Tip-I, yirmiden fazla insan kollajeni arasında en yaygın kollejen çeşididir ve hiyalin kıkırdak hariç bütün bağdokularda bulunur. Kemik, deri, tendon, göz akı, kornea ve kan damarlarının ana proteiniidir. Kollajen Tip-I kemik içerisindeki kollajenlerin yaklaşık %95'ini, kemik içerisindeki toplam proteinlerin ise %80'ini oluşturur [32]. Kollajen Tip-III ve Tip-V kemik yapısında az miktarda bulunan diğer kollajen çeşitleridir. Kemik matriksi diğer bağdokulardan farklı olarak kalsifiye olma özelliğine sahiptir. Mil veya plaka şeklindeki hidrosiapatit kristalleri kollajen fiberlerin üzerinde ve aralarında bulunurlar. Bu kristaller kollajen fiberlerle aynı doğrultuda yönelme özelliğine sahiptirler [33].

ECM içerisinde bulunan ve kollajen olmayan diğer proteinler sialoprotein, osteonektin, osteopontin ve osteokalsindir. Bu proteinler yüksek miktarda aspartik asit ve glutamik asit kalıntıları ihtiva ederler. İçerdikleri karboksil grupları sayesinde kalsiyum iyonlarının ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kemik yapısına katılmasını sağlarlar [34].

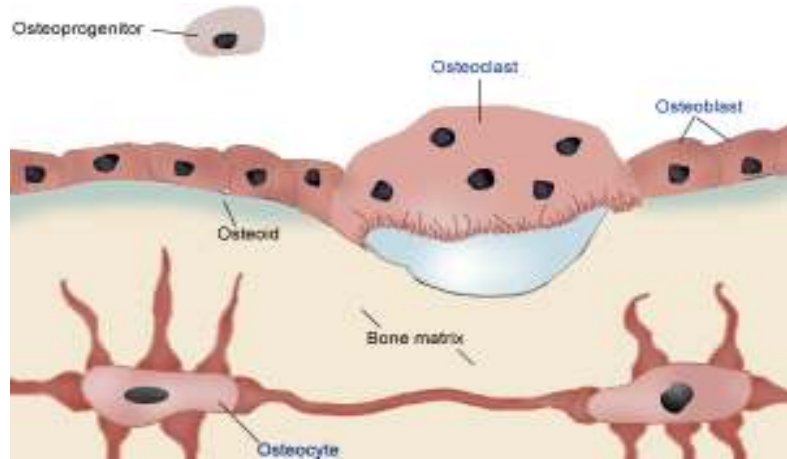
### 2.1.2. İnorganik Matriks

İnorganik matriks, kemiğe mukavemet sağlama ve iyon depolama olmak üzere iki temel fonksiyona sahiptir. Günümüze kadar yapılmış olan araştırmalara göre kemik yapısında bulunan mineral tuzlar, bütün vücuda ait kalsiyumun %99'unu, fosforun %85'ini, sodyum ve magnezyumun %50'sini içermektedir [35].

Hidroksi apatit (HA), kemik dokusu içerisindeki en önemli inorganik bileşendir. Ancak kemik mineralleri sadece HA'den oluşmazlar. HA dışında hidroksil ve fosfat grupları içeren karbonat iyonları da yapı içerisinde yer alır. Apatit kristalleri genellikle 20-50 nm uzunluğunda, 15-30 nm genişliğinde ve 2-10 nm kalınlığında plakalardan oluşur [36]. Yapıdaki karbonat miktarının %4-6 olması durumunda hem HA 'in kristallik oranı azalır hem de kalsiyum eksikliği ortaya çıkar. Karbonat bileşenleri dışında potasyum, magnezyum, stronsiyum, sodyum, klor ve flor da kemik yapısı içerisinde yer alır. Flor dışında diğer safsızlıklar HA'in kristalinitesini düşürür. Bunun sonucu kemik homeostazı oluşur ve kemiğin yeniden şekillenmesi için çok önemli olan kemik minerali daha çözünür bir hale gelir [37, 38].

### 2.1.3. Kemik Hücreleri

Kemik dokusunda osteoprogenitör, osteoblast, osteosit, ve osteoklast olmak üzere dört çeşit kemik hücresi bulunmaktadır. (Şekil 2-2)



Şekil 2.2: Kemik hücreleri [39].

#### 2.1.3.1. Osteoprogenitörler

Kemik gelişiminde ve kırık iyileşmesi esnasında aktif hale geçen, mezankimal kök hücrelerden türeyen hücrelerdir. Kemik oluşumu sırasında moleküler uyarıya cevap

vererek kendilerini kemik yapıcı hücelere dönüştürürler. Fibroblast, osteoblast, adiposit, kondrosit ve kas hücelerine dönüşme yetenekleri vardır. Osteoprogenitörler kemiğin iç/dış yüzeylerinde ve kemik iliğinde bulunurlar. Morfolojik olarak bu hüceler periosteumun iç yüzeyini kaplayan periostal hücelerle birlikte kemik iliği kanalını, Haversian kanallarını, Volkmann kanallarını kaplayan endostal hüceleri de oluştururlar. Osteoprogenitör hüceler gelişen kemik içerisinde soluk renkli, uzun veya oval çekirdekli, hafif asidofilik veya bazofilik sitoplazmaya sahip, basık veya pul şeklinde hüceler olarak görünürler. Endoplazmik retikulum, ribozom, golgi aygıtı ve diğer organellere sahiptirler [40].

### **2.1.3.2. Osteoblastlar**

Osteoblastlar kemik matriksini salgılayan farklılaşmış kemik yapıcı hücelerdir. Fibroblast ve kondroblastlara benzer şekilde bölünme yeteğine sahip salgı hüceleridir. Bu hüceler osteoid olarak da bilinen, henüz mineralize olmamış başlangıç kemiğini oluşturan kollajen Tip-I ve kemik matriksi proteinlerini salgırlar. Osteoblastlar tarafından salgılanan kemik proteinleri; osteokalsin ve osteonektin gibi bağlayıcı proteinler, sialoprotein, osteopontin, trombospondin gibi yapışkan glikoproteinler, çeşitli proteoglikanlar ve alkali fosfatlardır. Klinik çalışmalarda, vücut içerisindeki alkalın fosfat ve glikoprotein seviyelerinden yararlanılarak osteoblast aktivitesi takip edilebilmektedir.

Osteoblastların bir diğer görevi de kemik matriksinin kalsifikasyonudur. Kalsifikasyon süreci, matriks içerisinde osteoblastlar tarafından matriks vesikülleri denilen 50-250 nm boyutlarında küçük keseciklerin salınması ile başlar. Vesiküller, alkalın fosfat içeriği olarak zengindirler ve sadece kemik matriksi oluşumu sırasında salınırlar.

Osteoblastlar ışık mikroskobu altında kübik yada poligonal şekilleriyle ve oluşan kemik yüzeyinde tek katman şeklinde yanyana dizilimiyle dikkat çekerler. Sitoplazmaları oldukça bazofiliktir ve büyük golgi aygıtları, çekirdekleri yanında boş bir alanmış gibi görünür. Osteoblastlar yeni oluşan matriks içerisinde aktif olarak bulunmalarına rağmen, kemik yüzeyini kaplayan ve inaktif durumda bulunan osteoblastlar da vardır. İnaktif osteoblastlar osteoprogenitör hücelere benzerler. Osteoblastlar kemik büyümesi veya şekillenmesi süreçlerinde mekanik uyarılara cevap verirler. Osteoid yıkımı esnasında, osteoblastlar matriks tarafından sarılarak osteositlere dönüşürler [40].

### **2.1.3.3. Osteositler**

Osteositler, osteoblastlar tarafından salgılanmış olan matriks tarafından çevrelenmiş olgun kemik hücreleridir. Bu hücreler kemik matriksinin bakımından sorumludurlar. Kemik üzerine uygulanan kuvvete cevap verme yetenekleri olduğu için mekanik sensör olarak görevlidirler. Osteositler matriks degradasyonu sürecinde görev aldıkları gibi yeni matriks sentezleme yetenekleri de vardır. Osteositlerin bu aktiviteleri kalsiyum dengesinin sağlanmasına yardım eder. Osteositlerin travmaya bağlı veya normal ölümleri, osteoklastlar tarafından gerçekleştirilen kemik resorpsiyonu ile sonuçlanır. Bunu takiben kemik matriksinin osteoblastlar tarafından yenilenmesi ve yeniden şekillendirilmesi gerçekleştirilir.

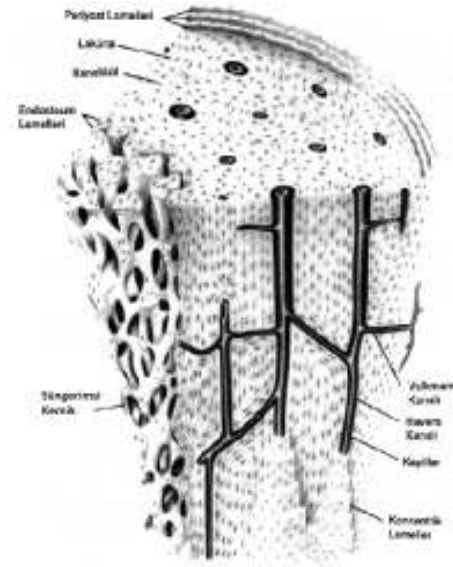
Her osteosit, mineral matriks içerisinde lakuna adı verilen bir boşlukta bulunur. Osteosit hücrelerin komşu hücrelerle ve kemik zarı ile bağlantılarını sağlayan, kanalikül olarak isimlendirilen sitoplazmik uzantıları vardır. Osteositler ayrıca dolaylı olarak nitrik oksit ve glutamat taşıyıcılar gibi sinyal moleküllerini kullanarak osteoblastlarla, kan damarlarıyla ve diğer kemik hücreleriyle bağlantı kurabilirler. Osteositler, çekirdeklerini çevreleyen sitoplazma miktarı az olduğu için prekürsörlerine göre daha küçük boyutlara sahiptirler [40].

### **2.1.3.4. Osteoklastlar**

Osteoklastlar, kemik yıkımından sorumlu ve hematopoetik kök hücrelerden türeyen çok çekirdekli hücrelerdir. Boyutları 20-100 µm arasında değişir. Şekilleri buldukları kemik yıkım döngüsü aşamasına bağlı olarak yassı veya yuvarlak olabilir [41]. Çok sayıda lizozomları, mitokondrileri ve gelişmiş golgi aygıtları vardır. Osteoklastlar kemik yüzeyinde Howship lakünası adı verilen boşluklara yerleşirler. Bu hücreler fırça şeklinde stoplazmik uzantılara sahiptirler. Osteoklastlar dalgali kenarları üzerindeki stoplazmik uzantıları vasıtasıyla hidroklorik asit ve kolajenaz salgılayarak inorganik matriksin çözünmesini sağlarlar. Hafif asidik (pH=4-4,5) bu salgılar, mineral kemik matriksini oluşturan HA kristallerini çözer. Diğer yandan çeşitli enzimler ve kolajenazlar HA kristallerini koruyan kollajen matriksini önemli ölçüde azaltırlar. Bir sonraki aşamada degradasyon kalıntıları resorpsiyon boşluğundan uzaklaştırılır ve ECM içerisine salınır [42-45].

#### 2.1.4. Kemik Tipleri

Kemiğin yapısı genel olarak kompakt kemik ve süngerimsi kemik olarak ikiye ayrılabilir. Kompakt kemik ve süngerimsi kemik karşılaştırıldığında benzer matriks bileşenlerine sahip olmalarına rağmen kütleleri arasında çok büyük bir fark vardır. Kompakt kemiğin yoğunluğu süngerimsi kemiğe oranla çok yüksektir [46]. Şekil-2.3 kompakt kemik ve süngerimsi kemiğin yapılarını göstermektedir.



Şekil 2. 3: Kompakt ve süngerimsi kemiğin şematik görünümü [47].

Kompakt kemik, ilik kanalını ve süngerimsi kemiğe ait trabekül plakalarını çevreler. Olgun bir iskeletin %80'ini kompakt kemik oluşturur. Kompakt kemik %80-90 oranında mineralize olmuştur ve yapısında çok az gözenek bulundurur [48]. Uzun kemiklerin metafiz, diyafiz ve epifiz kısımları kompakt kemik ile kaplıdır. Epifizin iç kısmı süngerimsi kemikten oluşur. Omurga, kafatası, leğen kemiği gibi kısa kemiklerin dış yüzeyleri de kompakt kemik ile kaplıdır. Ancak bu kemikler uzun kemiklere oranla daha fazla süngerimsi kemik ihtiva ederler. Süngerimsi (trabeküler) kemik %50-90 aralığında poroziteye sahiptir. Sahip olduğu yapı nedeniyle basma dayanımı kompakt kemikten 20 kat daha düşüktür. Süngerimsi kemik trabekül adı verilen değişik boyutlardaki çubuk ve plakaların süngere benzer şekilde organize olmasıyla oluşur [49-51]. Trabeküler kemiğin içinde kemik iliği, kan damarları, bağ dokusu bulunur ve sadece %15-25 oranında mineralize olmuştur [48].

Aynı kimyasal bileşime sahip olmalarına rağmen, yapıları arasındaki fark nedeniyle kompakt kemik ve süngerimsi kemiğin mekanik özellikleri birbirinden çok farklıdır.



Kompakt kemik burkulma ve eğilme kuvvetlerine karşı dirençliyen, süngerimsi kemik esneklik ve darbe emici özelliğe sahiptir.

Kompakt kemik ve süngerimsi kemik, primer (olgunlaşmamış) ya da sekonder (lamellar-olgun) kemikten oluşabilir. Primer kemik embriyonik kemiklerde görülür ve daha sonra yerini sekonder kemiğe bırakır. Yetişkinlerde primer kemik kırıkların iyileşme sürecinin başlangıç aşamasında, kafatası kemiği eklemlerinde, kulak kemikçiklerinde ve epifiz plakasında görülür. Primer kemik sekonder kemiğe oranla daha yüksek metabolik aktiviteye sahiptir. Primer kemik dağınık ve düzensiz bir görünüme sahipken sekonder kemik oldukça düzenli bir yapıya sahiptir.

Lamellar kemiğin kesiti mikroskopla incelendiğinde kollajen fibrillerin çok sıkı bir şekilde paketlenmesi ile meydana gelen katmanların paralel olarak organize olduğu görülür. Lamellerin eş merkezli halkalar şeklinde organize olması ile Haversian sistemi olarak da bilinen osteonlar oluşur. Osteonlar, içerisinde kan damarı, lenf damarı ve sinir bulunduran merkez kanallarını (Haversian kanalları) çevrelerler. Haversian kanalları ve sistemi çevreleyen hücreler arasında osteositler bulunur. Osteositler, kanalikuli adı verilen sitoplazmik uzantıları vasıtası ile besin maddelerinin mineral matriksle çevrelenmiş sistem içerisine difüze olmalarına yardım eder. Haversian kanalları, endosteum ve periosteum arasında bağlayıcı olarak görev alan ve Volkmann kanalları olarak isimlendirilen yatay kollara sahiptirler [52].

### **2.1.5. Kemik Onarımı**

Kemik iyileşmesi, hasar görmüş kemik dokusunun hasardan önceki fiziksel ve mekanik özelliklerini geri kazanmasıdır. Bu işlem sistemik ve lokal birçok faktörden etkilenir. Kemik iyileşmesi; iltihaplanma aşaması, onarım aşaması ve yeniden şekillenme aşaması olmak üzere birbirini takip eden üç basamakta gerçekleşir [53].

Kırılmaya karşı ilk cevap hücreseldir ve bir hematoma oluşur. Trombositler, makrofajlar, monositler, polimorfonükleer nötrofiller temizleme ve onarım proseslerini başlatmak için yaralanmış bölgede toplanırlar. Bu aşama iltihaplanma ile sonuçlanır. Kırılma, bölgedeki kan akışını kestiği için hücre ölümleri gerçekleşir ve kırık uçlarında çürüme gözlenir. Kırık oluşumundan sonraki ilk 8 saat ve takip eden 24 saatlik süreçte hücre bölünmelerinin arttığı gözlenir. Hücre bölünmeleri sadece kırılmanın olduğu bölgede değil bütün kemik içerisinde gerçekleşir [54]. Hücre bölünmeleri kemik genelinde ilk birkaç gün içerisinde yavaşlar, ancak kırık

bölgesi için iyileşme prosesi haftalarca devam eder. Bu noktada periosteum veya yumuşak dokularda bulunan mezankimal kök hücreleri, osteoprogenitörler, fibroblastlar ve endotel hücreler kemik iliği kanalını kullanarak bölgeye ulaşır [55]. Hücrelerin, faktörler ve proteinlerle etkileşimleri sonucu ikinci aşama olan onarım aşaması başlar.

İltihaplanma yavaşladıktan sonra kırık çevresinde kallus olarak adlandırılan fibröz doku tabakası oluşur [55]. Kemik, oluşan kallus içinde birkaç haftada yeniden şekillenir. Başlangıçta oluşan bu kırıkdağımsı/kemiksi kallus yumuşak kallus olarak isimlendirilir. Kallusun uç kısımlarında kırık oluşurken, kırığın olduğu kısımda kemik oluşur. Yumuşak kallus basma ve eğilme kuvvetlerine karşı koyacak kadar rijit değildir. Süreç ilerledikçe kırık doku endokondral ossifikasyon yoluyla primer kemiğe dönüşürken, mezankimal hücreler ve osteoblastlar kallus içinde doğrudan kemik oluşturabilir [53]. Gerçekleşen bu iki iyileşme süreci kırık bölgesinin mekanik rijitliğini artırır.

Kemik iyileşmesinin son aşamasında kallus içerisinde oluşan primer kemik yavaş yavaş sekonder kemik olarak şekillenmeye başlar [55]. Osteoklastların resorpsiyonu ile mineralize kallus ve ilik kanalı oluşur. Bu aşamada mineralize kallus kemik tarafından gördüğü strese karşılık vererek kemiğin orijinal çapında şekillenmesini sağlar. Yeniden şekillenme evresinin tamamlanması yıllar sürer. Yeniden şekillenme çocuklarda tamamiyle gerçekleşirken yetişkinlerde sınırlıdır. Bunun nedeni çocuklarda periosteumun yetişkenlere nazaran daha kalın ve daha çok hücreye sahip olması olabilir [56].

## **2.2. Doku Mühendisliği**

Langer ve Vacanti'ye göre doku mühendisliği; dokuların yenilenmesini, onarılmasını veya fonksiyonlarının iyileştirilmesini sağlayan biyolojik yardımcı materyallerin geliştirilmesi için, mühendislik ve yaşam bilimlerinin prensiplerini uygulayan interdisipliner bir araştırma alanıdır [57]. Klasik biyolojik yaklaşımdan farklı olarak doku mühendisliği, doku oluşumunu ve yenilenmesini anlama temeline dayanır, sınırlı işleve sahip implantlar kullanmak yerine yeni fonksiyonel dokuların üretilmesini amaçlar. Araştırmacılar fizik, kimya, mühendislik, malzeme, biyoloji ve tıp bilimlerine ait temelleri ortak bir çatı altında toplayarak bu amaca ulaşmayı hedeflemektedirler [58].

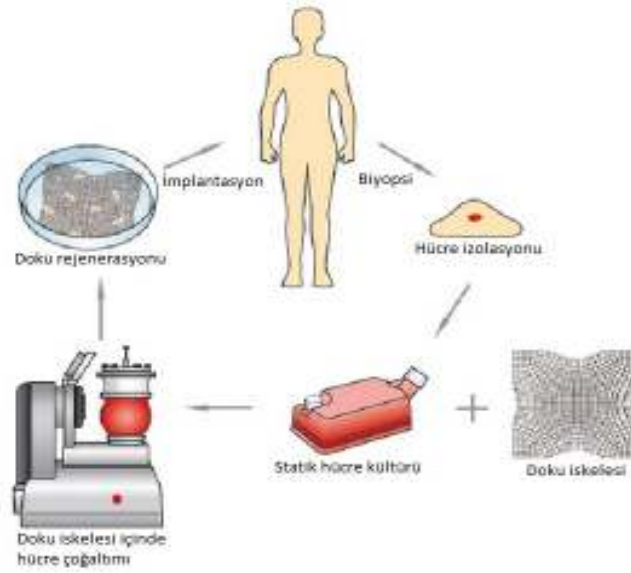
Yaralanma veya hastalık sonucunda meydana gelen doku kayıpları ve organlardaki işlev yetersizlikleri önemli sağlık problemleridir. Geleneksel tedavi yöntemleri olan implantasyon ve transplantasyon uygulamaları, dokuya ait fonksiyonları hasarsız bir şekilde onarılması da son 50 yıl içerisinde genel olarak başarılı oldukları söylenebilir. Cerrahi onarımlarda, alternatif olarak oto greftler (hastanın kendisine ait doku), allogreftler (aynı cinse ait doku) ve xenogreftler (farklı cinse ait doku) yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bu metotların kendilerine has bazı eksiklikleri vardır. Kullanılan dokuların avasküler olması, dokunun alındığı bölgede hasar oluşması, greftin alındığı donör dokunun ölme olasılığı gibi problemler bu uygulamaların kullanımını kısıtlar. Bu kısıtlamaların dışında greft dokunun rezorpsiyonu, immün reddi, uzun süreli immünoşüpresan ilaçların gereksinimi, patojen içerikler, etik ve dini tepkiler göz önünde bulundurulması gereken diğer olumsuz faktörlerdir [59].

Doku rejenerasyonu konsepti Vacanti ve arkadaşlarının 1988 yılında yaptıkları çalışmalara dayanmaktadır. Bu bilim insanları vücuttan ayrılmış hücrelerin, bir rehber şablon varlığında kendilerini doku yapısı oluşturacak şekilde organize ettiklerini gözlemlemişlerdir. Rehber şablon olarak da biyobozunur doku iskelesi kullanmışlardır. Hücrelerin vücuda doğrudan transplantasyonları ölümleriyle ya da fonksiyonlarını yitirmeleriyle sonuçlanır. Birçok hücre tipi çoğalabilmek ve sahip olduğu özellikleri yerine getirebilmek için tutunacak yüzeye ihtiyaç duyar. Bu nedenle in-vitro doku üretimlerinde biyoaktif bozunur doku iskelelerinden yararlanılır. Doku iskeleleri kültürlenmiş hücrelerin fiziksel ve kimyasal ihtiyaçlarını karşılayarak, hücrelerin farklılaşması ve üç boyutlu dokulara bağlanması için onlara rehberlik ederler [60].

### **2.3.1. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Temel Faktörler**

Klasik doku mühendisliği stratejisi; biyopsi yoluyla hastadan spesifik hücrelerin izolasyonu, bu hücrelerin kontrollü şartlar altında üç boyutlu biyomimetik doku iskeleleri üzerinde büyütülmesi, oluşan bu yapının hastaya implante edilmesi ve zamanla deşere olan doku iskelesi içerisinde oluşan yeni dokunun yönetilmesi şeklinde tanımlanabilir. Şekil 2.4 doku mühendisliği prosesini şematize etmektedir. Hasarlı organ veya dokunun başarılı bir şekilde yenilenebilmesi için göz önünde bulundurulması gereken üç kritik husus vardır;

- 1) Hücrelerin çoğalması ve farklılaşabilmesi için mekanik ve biyolojik desteği sağlayan doku iskeleleri
- 2) Spesifik hücelere dönüşme kabiliyetine sahip kök hüceler
- 3) Hücresel aktiviteleri yönetecek indükleyici büyüme faktörleri [61].



**Şekil 2.4:** Doku mühendisliği prosesi [62].

Hücrelerin doku mühendisliğinde temel faktörlerden bir tanesi olmasının sebebi çoğalma, farklılaşma, sinyalizasyon ve ECM oluşturma gibi kabiliyetlerine sahip olmalarıdır. Hücreler, tasarlanmış doku iskelesinin bir parçası olabileceği gibi, iletici veya uyarıcı biyomalzeme ya da biyoajanlar yardımıyla *in-vivo* olarak da kullanılabilirler. Otolog hücre kaynakları biyopsilerinin ve kullanımlarının sağladığı kolaylıktan dolayı en iyi seçenektir. Tasarlanan dokuya ait hücresel bileşen geliştirilirken dikkat edilmesi gereken hususlar şu şekilde sıralanabilir [63];

- Uygun hücrenin tanımlanması
- Hücrenin birincil kaynaktan izolasyonu
- Çoğaltılma sırasında fenotipinin veya fonksiyonlarının değiştirilmesi
- Hücre kültürünün virüs ve bakteri gibi organizmalardan korunması.

Doku iskeleleri, doku mühendisliği yaklaşımlarında temel bileşenlerden bir tanesidir. Hücrelerin tasarlanmış doku içerisindeki organizasyonu, gelişimi ve değişimi doku iskelesi tarafından yönlendirilir. Doku iskelesi hücreler için mekanik destek sağlamanın yanında doku oluşumu sırasında gerekli olan kimyasal ve

biyolojik ihtiyaçları da karşılamalıdır [64]. Biyomalzemenin hücreler ile uyumu, orijinal ECM'de olduğu gibi moleküler düzeyde de hassas ve kontrollü olmalıdır. Aynı zamanda malzemenin degradasyonu sonucu oluşan ürünler toksik ve immünojen olmamalı, malzemenin degradasyon hızı ile üretilen dokunun oluşma hızı örtüşmelidir.

Biyomimetik malzemelere ulaşmak için ya sıfırdan yeni bir malzeme sentezlemek ya da var olan malzemeleri biyoaktif moleküllerle modifiye etmek gerekir. Son çalışmalarda insan sağlığı için zararlı olmadığı kanıtlanmış malzemelerin modifikasyonu ön plana çıkmaktadır. Biyoaktif moleküllerin modifikasyon için kullanılma amacı hücrelerin doku iskelesi üzerine bağlanarak burada yayılmalarını, çoğalmalarını ve değişmelerini sağlamaktır. Biyoaktif moleküller, ECM'e ait tüm moleküller veya bu proteinlerden izole edilmiş sadece hücre bağlanması için gerekli olan moleküller olabilir. Biyoaktif moleküllerin seçimi, ekilen hücre tipine, doku iskelesine, orijinal ECM'e ve gerekli olan hücresel cevaba bağlıdır [61].

### **2.3.2. Kemik Doku Mühendisliği**

Travma ya da patolojik lezyon kaynaklı büyük kemik hasarları, prognozlarının ve tedavilerinin zorluğundan dolayı klinik problemlerin başında gelir. Bu tür hasarların tedavisinde kullanılan en yeni yaklaşım kemik doku mühendisliğidir [65]. Kemik doku mühendisliğinin dayandığı iki temel konsept vardır. Bunlardan birincisi; otolog hücrelerin *in-vitro* olarak doku iskelesi üzerinde çoğaltılması, ikincisi ise; doku iskelesinin hasarlı bölgeye yerleştirilmesi ve hastaya ait hücrelerin hasarlı dokuyu yenilemesine izin verilmesidir. Dokunun yenilenme prosesi süresince doku iskelesi degradasyona uğramalı, doku tamamen yenilediğinde iskele ortamda bulunmamalı ve dokunun faaliyete geçmesine izin vermelidir. Bu yaklaşım greft uygulamalarına ait bazı eksiklerin önüne geçer [66, 67].

Geleneksel otogreft ve allogreft prosedürleriyle karşılaştırıldığında kemik doku mühendisliği teknikleri donör azlığı, tedarik zorlukları, patojen bulaşması ve immün reddi gibi problemleri ortadan kaldırır [68,69]. Bu nedenle kemik doku mühendisliği hızla gelişen bir araştırma alanı haline gelmiştir [70].

Kemik dokusu üretiminde; yapay ECM (doku iskelesi), osteoblast veya osteoblasta dönüşebilen hücrelerle birlikte hücrelerin büyümesine, değişimine ve mineralizasyonuna katkıda bulunan faktörler kullanılır. Bu bileşenlerden yüksek

poroziteye sahip doku iskeleleri hücre ekimi, çoğaltılması ve üç boyutlu doku oluşturulmasında kritik bir rol oynar [8, 71]. Doku iskelesi hücreler için üç boyutlu bir zemin sağlarken, doku oluşumu için de bir şablon görevi görür. İdeal bir doku iskelesi; biyouyumlu ve biyobozunur olmalı, hücreler arası etkileşime izin vermeli ve doku gelişimi için gerekli olan mekanik ve fiziksel özellikleri karşılamalıdır [70].

Metaller, seramikler, polimerler ve bunların kombinasyonları kemik doku tedavisi için kullanılan malzemelerin başında gelir. Metaller ve seramikler biyolojik çevrede bozunur olmamaları ve işlenmeleri sınırlı olduğu için doku mühendisliği uygulamalarına uygun değildir [72]. Buna karşılık polimerler, bileşenleri ve şekilleri ihtiyaca göre belirlenebildiği için mükemmel dizayn esnekliğine sahiptirler. Biyobozunurluk polimerlere moleküler olarak kazandırılabilir. Bazı polimerler vücut sıvısı içinde hidroliz olabilirken, bazıları hücresel veya enzimatik yollardan bozunabilir. Bu avantajlarından dolayı polimerler ilgiyi üzerlerine çekmektedir ve kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [73].

### **2.3.3. Sert Doku Onarım Malzemeleri**

#### **2.3.3.1. Greftler**

Kemik greftleri; osteojenik, osteoindüktif veya osteokondüktif özellikleri kullanarak kemik iyileşmesine katkıda bulunan, tek başına veya diğer malzemelerle kombinasyonları şeklinde implantasyonu yapılabilen malzemeler olarak tanımlanır [74]. Osteojenik malzemeler, içerisinde farklılaşabilen hücreler bulunduran ve doğal bir şekilde kemik oluşturma yeteneğine sahip malzemelerdir. Osteoindüktif malzemeler, lokal hücrelerin olgun osteoblastlara dönüşmesini sağlayan uyarıcı biyolojik sinyali sağlarlar. Osteokondüktif malzemeler ise lokal kemik dokusunun yenilenmesine yardım eden üç boyutlu doku iskelesi görevi üstlenirler. Osteokondüktif malzemeler kemik oluşturma veya kemik oluşumunu indükleme özelliğine sahip değildirler. Greftler için diğer önemli özellikler biyobozunurluk, porozite, yüzey geometrisi ve yüzey kimyası olarak sıralanabilir [75]. Ototogreft, allogreft ve zenogreft olmak üzere üç tip kemik grefti vardır.

##### **2.3.3.1.1. Ototogreft**

Kemik greftleri; hastadan, bir donörden veya kadavradan alınıp kemik dokusunun iyileşmesi için ihtiyaç duyulan bölgeye yerleştirilen kemik parçalarıdır. Ototogreftler ise kemik doku mühendisliği alanında altın standart olarak nitelendirilirler

[74,77,78]. Ototogreft, hastanın kendisinden (genellikle kalça kemiğinden) alınan ve ihtiyaç duyulan yere implante edilen greftlerdir. Ototogreftlerin kökeni hastaya ait olduğu için çok nadir immün yanıt gösterirler. Ototogreftler, kemik doku mühendisliğinin temel gereksinimlerini karşılamalarına rağmen bazı eksikliklere sahiptir. Genellikle greftin alındığı bölgede doku ölümü ve enfeksiyonla karşılaşılır. Böyle durumlarda donör bölge implantasyon yapılan bölgeye göre daha çok acı verebilir. Karşılaşılan diğer bir sorun ise donör bölgeden alınabilecek doku miktarının sınırlı olmasıdır. Bu gibi eksiklikler nedeniyle otogreftlerin yerini tutabilecek yöntemlerin arayışları hızlanmıştır [76].

#### **2.3.3.1.2. Allogreft**

Kemik doku mühendisliğinde greft çözümlerinden bir diğeri allogreftlerdir. Allogreftler kadavra veya bir donörden alınan greftlerdir. Bu greftler donörden alındıktan sonra hastalık geçişlerini önlemek amacıyla dondurma, ışınlanma veya liyofilize etme gibi proseslerden geçirilirler [3]. Allogreftler değişik şekil ve büyüklükte elde edilebilir. Kadavra veya donör kökenli oldukları için hastanın ikinci bir cerrahi operasyon geçirmesine gerek yoktur. Bu durum donör bölgeye ait morbidite gibi komplikasyonları ortadan kaldırır. Allogreftler uygulanan sterilizasyon prosedürlerine rağmen çok iyi sonuç vermeyebilir. Osteojenik olmadıkları gibi otogreftlere göre daha az osteokondüktif ve daha az osteoindüktif özelliğe sahiptirler. Liyofilize işlem gördükleri için otogreftlere nazaran düşük mekanik özellikler sergilerler. Allogreftler hastanın kendisine ait dokular olmadığı için immün yanıtla karşılaşma olasılıkları yüksektir ve bu nedenle immün önleyici ilaçlarla birlikte kullanılırlar [76].

#### **2.3.3.1.3. Zenogreft**

Zenogreftler bir türden alınıp başka bir türe implante edilen greftlerdir [74]. Kemik tedavisinde genellikle zenogreft olarak inorganik sığır kemiği kullanılmaktadır. Bu greftler içerdikleri organik yapılardan arındırılmak amacıyla kimyasal ve termal işlemlerden geçirilirler. Neredeyse tamamen hidroksiapatitten meydana gelirler ve insan kemiği ile benzer özelliklere sahiptirler. Mekanik dayanımları çok düşüktür. Zenogreftler kolaylıkla kırılabilirler için kemik iyileşmesi sürecinde sınırlı mekanik destek sağlayabilirler ve cerrahi operasyonlarda kullanımları zordur. İmmün riski yüksek olduğu için kullanışlı değildirler. İmmün riskini azaltmak için

uygulanan deproteinizasyon işlemleri sırasında aktif proteinlerin de uzaklaştırılmasından dolayı osteoindüktif özellikleri kaybolur [3].

#### **2.3.3.1.4. Diğer Greftler**

Yukarıda bahsedilen greftlerin dışında metaller ve seramikler de alternatif kemik greftleri olarak kullanılmaktadırlar. Genellikle kırık ve omurga tedavilerinde kullanılan metal implantlar titanyum, paslanmaz çelik ve kobalt içerirler [79, 80]. Bu implantların osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri yoktur. Kemik dokusuyla karşılaştırıldıklarında daha yüksek mukavemete sahiptirler ve gerilmeye karşı koruyucu etki sağlarlar.

Seramikler yüksek sıcaklıkta üretilen inorganik kristalin malzemelerdir. Kalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat ve hidroksiapatit gibi inorganik moleküller içerirler [74, 81]. Osteokondüktif özelliklere sahip oldukları için kemik oluşumuna destek olurlar. Ancak düşük mekanik özellikleri ve yüksek çözünme hızları yük dayanımı açısından tatmin edici değildir.

#### **2.4. Doku İskeleleri**

Doku iskeleleri kemik ECM 'ini taklit edip, hücre yapışmasına, göçüne, çoğalmasına ve farklılaşmasına öncülük ederek, doku yenilenmesinin üç boyutlu olarak gerçekleşmesini amaçlarlar [82]. Doku iskeleleri; ileri malzeme ve proses teknolojileriyle üretilmiş gözeneklere ve kanallara sahip üç boyutlu yapılardır. Bu yapılar süngerimsi, film, jel veya daha kompleks şekillerde elde edilebilirler.

Sert doku onarımında kullanılan doku iskeleleri hücrelerin yapışmasına, çoğalmasına ve farklılaşmasına yardım ederek, sağlıklı dokunun oluşturulmasında ve fonksiyonların yeniden kazanılmasında görev alırlar. Hasarlı dokunun iyileşmesi sürecinde şekillerini, mukavemetlerini ve biyolojik bütünlüklerini koruyan sert doku iskeleleri, iyileşme süreci tamamlandığında ortamdan tamamen uzaklaşmış olurlar. Doku iskeleleri; biyoyumlu, radyolusen, kolay şekillendirilebilen, alerjik olmayan, kanserojen olmayan, gerekli mukavete sahip, zaman içerisinde kararlılığını, hacmini ve osteokondüktif özelliklerini koruyabilen malzemelerden üretilirler [83-87].

Kemik doku iskeleleri yukarıda bahsedilen özelliklerin dışında uygun poroziteye ve gözenek yapısına da sahip olmalıdırlar. Gözenek boyutu ve gözenekler arasındaki bağlantılar, iskele içerisinde büyüyecek hücre sayısını etkilediği gibi iskele içerisindeki madde ve besin transferini de etkiler. Diğer bir deyişle gözenek boyutu



dağılımı ve gözenekler arasındaki bağlantılar hücre ekimi, hücre göçü, matriks oluşumu, vaskülarizasyon ve besin transferi için elverişli olmalıdır. Optimum gözenek boyutu üzerinde bir fikir birliğine varılamasa da daha önce yapılan çalışmalar 100-500µm aralığındaki gözenek boyutunun kemik oluşumu için uygun olduğunu göstermektedir [88-90].

Mekanik açıdan, doku iskeleleri dokunun hacmini koruyabilmesi ve dokunun yenilenebilmesi için ihtiyaç duyulan mekanik desteği sağlamalıdır. Doku iskelesi tarafından karşılanması gereken en önemli mekanik özellikler; sertlik, mukavemet ve yorulma direncidir. Doku iskelesi sertliğinin kemik dokusundan daha yüksek olduğu durumlarda oluşan stres yoğunlaşması kemik hatalarına yol açabilir. Bunun tersine doku iskelesi sertliğinin kemik dokusuna ait sertlik değerinden daha düşük olması durumunda, iskele içerisinde oluşacak stres yoğunluğu implant hatalarına yol açacak ve kemik atrofisi oluşacaktır. Doku iskelesi ve kemik dokusu arasındaki bu orantısız yük paylaşımı stres kalkını olarak bilinir [91]. Stres kalkını kemiğin şekillenme ve iyileşme proseslerini olumsuz yönde etkiler. Yükten az etkilenen kemik kendisini düşük strese adapte eder ve sonuç olarak düşük yoğunlukta, zayıf bir kemik dokusu oluşur. Kemik doku iskeleleri, doğal kemiğin sahip olduğu mukavemete eşit ya da daha yüksek mukavemete sahip olmalıdır. İmplantasyon yapılan bölgenin maruz kalacağı fiziksel kuvvetlerin, *in-vivo* olarak gelişen dokunun iskeleyi doldurma süreci tamamlanana kadar doku iskelesi tarafından kompanse edilmesi gerekir. Son olarak, vücut içerisinde emilimi yapılamayan doku iskeleleri için yorulma direnci çok önemlidir. Bu iskeleler tasarlanırken hastanın geri kalan hayatında maruz kalacağı döngüsel yüklenmeler göz önünde bulundurulmalıdır. Nihai ürün üretilirken mekanik özelliklere ve biyolojik ihtiyaçlara dikkat edilmeli, kimyasal içerik doku gelişimine izin verecek şekilde seçilmelidir.

Doku iskelesi dizaynında yüzey topografisi, yüzey enerjisi, kimyasal bileşim, yüzey ıslanabilirliği, yüzey biyoaktivitesi gibi yüzey özellikleri büyük önem taşır. Bu özellikler doku iskelesinin sadece dış yüzeyi için değil üç boyutlu iç yüzeyi için de önemlidir. Kullanılan polimerik malzemelerin biyoaktif moleküllerle modifiye edilmesi iskeleye biyoaktif özellik kazandırmak için uygulanan bir tekniktir. İmplant ile doku arasındaki mikro-hareketleri azaltmak için uygun bir yüzey tasarlanabilir. İhtiyaç duyulan arayüzey özellikleri sadece yüzey kimyasıyla alakalı değil aynı zamanda nanometre ve mikrometre ölçeğindeki yüzey topografisiyle de alakalıdır.

Yapılan çalışmalar yüzey pürüzlülüğünün hücre morfolojisini ve büyümesini etkilediğini göstermiştir. Pürüzlü yüzeylerin hücre yapışması için düz yüzeylere oranla daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir [92, 93].

Kemik doku iskeleleri için bir diğer önemli konu cerrahi operasyon sonrası stabilitenin korunmasıdır. Operasyon sonrasında implant ve kemik dokusu sıkıca birleşmiş olmalı ve osteo-integrasyon sağlanmış olmalıdır. Doku iskelesinin anatomik açıdan geometrisi hasarlı bölgeyle aynı boyutlarda olmalı ve hasarı tamamen doldurmalıdır. İleri bilgisayar destekli teknolojiler sayesinde hastaya özgü doku iskeleleri üretilebilmektedir [94].

### **2.4.1. Doku İskelelerinde Kullanılan Malzemeler**

Doku iskelesi üretiminde en yaygın olarak kullanılan malzemeler doğal polimerler ve sentetik polimerlerdir. Polimerik doku iskelelerinin mekanik ve biyolojik özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılan seramiklere de doku iskelesi malzemeleri içerisinde yer verilir.

#### **2.4.1.1. Doğal Polimerler**

Bitki, hayvan veya insan dokularından elde edilen kollajen, fibrin, glikozaminglikanlar (GAG), kitosan, aljinatlar ve nişasta doku iskelesi üretiminde yaygın olarak kullanılan doğal polimerlerdir [95, 96]. Doğal polimerler yüksek biyouyumluluğa sahip malzemelerdir. Toksiklik oranları ve immün yanıtla karşılaşma olasılıkları düşüktür. Avantajlarının yanında üründen ürene değişiklik göstermeleri, düşük mekanik özelliklere sahip olmaları ve proses zorlukları bu polimerlere ait dezavantajlar olarak sayılabilir. Diğer doğal malzemelerle ve sentetik malzemelerle birlikte kullanılabilirler. Doğal olarak veya enzimler vasıtasıyla bozunabilirler. Mekanik özelliklerinin geliştirilmesi için genellikle kimyasal modifikasyona ihtiyaç duyarlar.

##### **2.4.1.1.1. Kollajen**

Doku iskelesi üretiminde en çok kullanılan doğal polimerlerden bir tanesi kollajendir. Kollajen; uzun, gergin, üç-sarımlı helizonik yapıya sahip bir fibröz proteindir. Ekstraselüler matrisin ana proteini ve bağ dokusunun bir bileşeni olan kollajen, bu dokular için mekanik destek sağlar. İnsan vücudunda en çok bulunan kollajen çeşitleri; Tip-I (deri ve kemik), Tip-II (kıkırdak) ve Tip- III kollojenleridir (damar).

Kollajen doğal polimeri sutürlerin ve hemostatik ajanların (toz, sünger, örtü ) üretiminde, kan damarları (ekstruder tüp), tendon, bağ doku, dermal yanık ve periferik sinirlerin tedavilerinde kullanılmaktadır [96-99].

#### **2.4.1.1.2. Kitosan**

Kitosan, kitinin N-deasetile türevidir. Doğal bir polisakkarit olan kitosan kabuklu canlıların ve böceklerin dış iskeletinde bulunur [100, 101].  $\beta$ -(1-4) bağlı D-glikozamin ve rastgele dağılmış N-asetil-D-glikozaminoglikan gruplarından oluşurlar. Kitosan vücut içerisinde enzim yoluyla bozunabilen bir polimerdir.

Toksik olmayışı, biyobozunur olması ve iyi yapısal özelliklere sahip olması kitosanı doku mühendisliği uygulamaları için cazip kılmaktadır. Kitosanın degradasyon hızı içerdiği asetil miktarı ile değişir [102]. Molekül ağırlığı ve deasetillenme derecesi bu polimerin fiziksel ve mekanik özelliklerini etkilemektedir [103, 104].

Kitosan pH 7 değerinin üzerinde çözünmez ve pH 5 değerinin altında çözünür durumdadır. Kitosan pH değerinin yeteri kadar yüksek olduğu durumlarda güçlü fiberler oluşturarak jelleşir. Glutaraldehit gibi çapraz bağlama ajanları kullanılarak kovalent çapraz bağlı hidrojeller elde etmek mümkündür.

Kitosan kullanılarak membran ve matriks şeklinde doku iskeleleri üretilmektedir. Hepatosit hücreler ile yapılan biyolojik değerlendirmeler, hücrelerin kitosan doku iskeleleri üzerinde morfolojik özelliklerini koruduğunu ve biyolojik aktivitelerini sürdürdüklerini göstermiştir. Bununla birlikte kitosan, kemik doku tedavilerinde kondrosit hücrelerin yapışmasını ve gelişmesini desteklemek amacıyla kullanılmaktadır.

#### **2.4.1.1.3. Glikozaminoglikan**

Glikozaminoglikanlar (GAG), vücut ekstraselüler matriksi içerisinde bulunan glikoproteinlerdir. Yapılan çalışmalarda GAG ve kollajen kombinasyonu ile üretilen nanofiber doku iskelelerinin başarılı sonuçlar verdiği gözlenmiştir [105, 106].

GAG; uzun zincirli, lineer, karboksilik ve/veya sülfat ester grupları içeren disakkarit birimlerinden oluşur. Bu fonksiyonel gruplar kollajenle aralarında köprü ve bağ oluşturma yeteneğine sahiptir.

Hyaluronik asit, bağ dokusunun temel bileşenidir ve en yaygın GAG'ları içerir. N-asetilglikozamin ve glikoronik asit, yapılarında disakkarit tekrarlayan birimleri

bulunan anyonik polisakkaritlerdir. Tekrarlanan birim sayısı 500 ile bir kaç bin arasında değişir. Hyaluronik asit çok yüksek su bağlama kapasitesine sahiptir ve seyreltik çözeltileri yüksek viskozite değerleri gösterir.

Hyaluronan; deri, kıkırdak, göz camsı cismi gibi vücudun birçok dokusunda bulunur ve bu dokularla alakalı biyomedikal uygulamalarda kullanılır. İlk olarak göz ameliyatlarında ve daha sonra diz osteoartrit tedavilerinde kullanılmıştır [107]. Hyaluronanın jel ve film şeklindeki ürünleri, ameliyat sonrası yapışmaları engellemek amacıyla kullanılmaktadır [108]. Son çalışmalar hyaluronik asidin kıkırdak ve kemik doku tedavileri için üretilen doku iskelelerinde kullanılabileceğini göstermiştir [109, 110]. İzolasyonu ve modifikasyonu kolay olan hyaluronik asit, horoz ibiği ve mikrobiyal fermantasyon gibi doğal kaynaklardan elde edilebilmektedir.

#### **2.4.1.1.4. İpek Fibroin**

İpekler, ipek böceği ve örümcekler tarafından fiber şeklinde üretilen ilginç özelliklere sahip fibröz proteinlerdir. İpek fiberlerden üretilen sütürler yüzlerce yıldır kullanılmaktadır. İpek bazlı jel, sünger ve film şeklindeki biyomalzemelerin üretimine son yıllarda başlanmıştır.

Özellikle ipek böceğinin (*Bombyx mori*) ürettiği ipeğin değişik uygulamalarda biyomalzeme olarak kullanılabileceği keşfedilmiş ve bununla ilgili çeşitli proses mekanizmaları geliştirilmiştir [111, 112].

Genel olarak, ipek fibroin insan hücrelerinin büyümesini destekleyen yüksek biyouyumluluk sergileyen doğal bir polimerdir.

#### **2.4.1.1.5. Agaroz**

Agaroz deniz yosunlarından ekstrakte edilen bir polisakkarittir. Hücre gelişimine izin verdiği için özellikle doku kültür sistemleri başta olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Moleküler yapısı 1,4-bağlı-3-6 anhidro- $\alpha$ -galaktoz ve 1,3-bağlı- $\beta$ -D-galaktozun ardışık kopolimeri şeklindedir. Yapısında bol miktarda hidroksil grubu içerdiği için suda çözünürlüğü yüksektir. Agarozun çift sarmal yapısı zincirler arasında bulunan hidrojen bağları vasıtasıyla oluşur. Agaroz malzemeler enzimatik olarak degradasyona uğrarlar. Agaroz jellerin mukavemet ve geçirgenlik özellikleri içerdikleri agaroz konsantrasyonuna bağlıdır. Bu jeller

kıkırdak fenotipi ve sinir yenilenmelerini desteklediği için kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmaktadır [113].

#### **2.4.1.1.6. Aljinat**

Aljinat, kahverengi alglerin hücre duvarlarında bulunan doğal bir polisakkarittir. Agarozlara benzer şekilde suda çözünürlükleri yüksektir.  $\beta$ -D-mannuronat(M) ve  $\alpha$ -L-guluronat (G) olmak üzere iki monomerden oluşan bir polianyondur. Aljinatların fiziksel ve mekanik özellikleri gluronat blokların uzunluğu ve miktarı ile doğrudan alakalıdır.

Aljinatlar elektrolitik karaktere sahip polimerlerdir ve iki değerlikli katyonların (kalsiyum, stronsiyum veya baryum) varlığında jelleşirler. Aynı nedenden dolayı katyonların uzaklaştırılması durumunda aljinat jeller çözünür duruma geçerler. Ayrıca yapılan çalışmalar çeşitli hücre tiplerinin aljinat malzemeler üzerinde morfolojik özelliklerini koruduklarını göstermiştir [114].

#### **2.4.1.2 Sentetik Polimerler**

Kimyasal olarak sentezlenen biyobozunur polimerler çeşitlilik, kararlılık ve kolay işlenebilirlik gibi özelliklere sahip olmaları dolayısıyla doku iskelesi üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [115]. Doğal polimerlerle karşılaştırıldıklarında sentetik polimerler istenilen yapıda ve özelliklerde elde edilebilmektedirler. Sentetik polimerlerden alınacak sonuçlar daha tahmin edilebilirdir ve kararlılık gösterir [116].

Özel uygulamalar için üretilen doku iskelelerinin degradasyon hızı, polimer (kopolimer veya blend) seçimi ile istenilen oranda değiştirilebilir. Bu polimerlerin birçoğu basitçe hidrolitik degradasyona uğrarlar. Ancak biyoyumlulukları genellikle doğal polimerlerden daha düşüktür. Asidik polimerlerin degradasyon ürünleri, *in-vitro* hücre gelişimini etkileyebilir ve *in-vivo* inflamatuvar yanıtı neden olabilir.

Doku iskelesi üretiminde en yaygın kullanılan sentetik biyobozunur polimerler; poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit) (PLA) ve bu iki polimerin kopolimerleri veya blendleri, ve bir alifatik poliester olan polikaprolakton (PCL)'dur.

##### **2.4.1.2.1. Poli(glikolik asit), Poli(laktik asit) ve Kopolimerleri**

Poli( $\alpha$ -hidroksiasitler) hücre transplantasyonu ve doku yenileme uygulamalarında yaygın olarak kullanılan biyobozunur sentetik polimerlerdir. Doku mühendisliği

alanında en çok kullanılan poli( $\alpha$ -hidroksiasitler); poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit) (PLA) ve bunların kopolimerleridir [116-119].

Poli( $\alpha$ -hidroksiasitler) lineer alifatik poliesterlerdir ve vücut içerisinde hidroliz olarak bozunurlar. Bozunma hızları; yapısal konfigürasyonlarına, molekül ağırlıklarına, yüzey alanlarına, kristallik derecelerine, maruz kaldıkları gerilime, kalıntı monomer miktarına, implantasyon bölgesine ve kopolimerlik durumunda içerdikleri hidroksi asit miktarına bağlı olarak değişir.

Poli( $\alpha$ -hidroksiasitler) iyi mekanik özelliklere sahip malzemelerdir. Termoplastik oldukları için kalıplama, ekstrüzyon, çözücü dökme gibi yöntemler kullanılarak kolaylıkla film, tüp ve matriks gibi şekillerde elde edilebilirler.

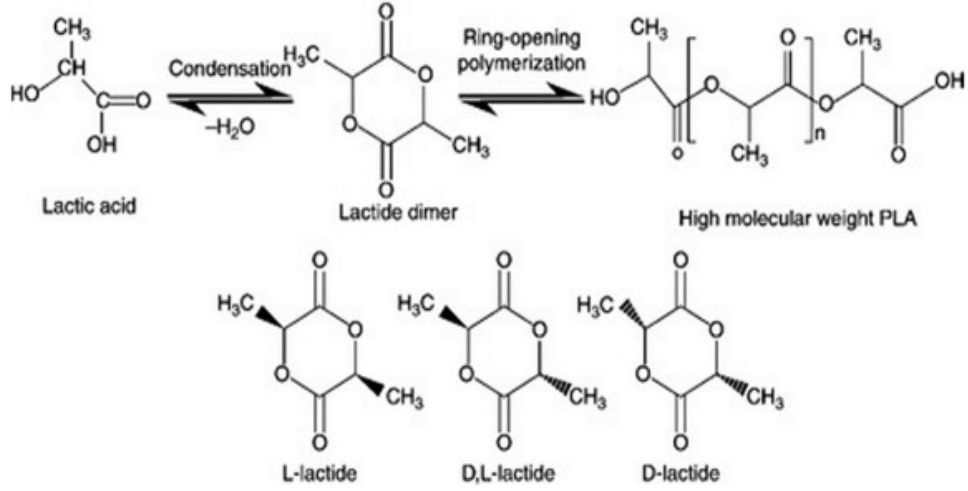
PGA, poli( $\alpha$ -hidroksiasitler) arasında en basit kimyasal yapıya sahip olan polimerdir. Bu özelliğinden dolayı yüksek kristalliğe, yüksek erime noktasına ve organik çözücüler içerisinde düşük çözünürlüğe sahiptir. PGA cerrahi suturelerin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. PGA suturelerin mekanik özellikleri, PGA 'in suya olan yüksek ilgisi nedeniyle biyolojik ortamda 4 hafta içerisinde zayıflamaya başlar.

PLA'in kimyasal yapısında PGA'e göre fazladan bir metil grubu bulunur ve bu metil grubu PLA'in daha hidrofobik olmasını sağlar. PLA'in bozunabilmesi için su moleküllerinin polimer zincirlerinde bulunan ester bağlarına ulaşması gereklidir. Bu nedenle PLA'in bozunma hızı PGA ile karşılaştırıldığında daha yavaştır. Buna karşılık PLA organik çözücülerde PGA'e göre daha yüksek çözünürlüğe sahiptir.

PLA kiral yapısından dolayı iki farklı stereoizomerik forma sahiptir ve üç tip PLA polimeri vardır. Bu polimerler D-PLA, L-PLA ve iki formun bir arada bulunduğu D,L-PLA'dir. Poli-L-laktat (PLLA), L-laktatın halka açılması polimerizasyonu ile elde edilen bir polimerdir. Şekil-2.5 PLA'in halka açılma polimerizasyonunu şematize etmektedir. PLLA'in kristalinitesi %37 civarında, camsı geçiş sıcaklığı 50-80°C aralığında ve erime sıcaklığı 180-190°C aralığındadır. Poli-D-laktat (PDLA) PLLA'e benzer fakat D-laktatın polimerizasyonundan elde edilir. Pratik uygulamalardan çok deneysel seviyelerde kullanılır. Poly-D,L-laktat (PDLLA) bir rasemik polimerdir. D-laktat ve L-laktat karışımından elde edilir. Amorf yapıya sahiptir ve camsı geçiş sıcaklığı 60°C civarındadır.

PLA'in kristallik derecesi, polimerin su tutma özelliğini ve degradasyon kinetiğini doğrudan etkiler. Su molekülleri, polimer içerisindeki amorf bölgelere daha kolay

ulaşabildiği için bozunma bu bölgelerde daha hızlı gerçekleşir. Düşük kristallige sahip olan PDLA, PLLA'e göre daha hızlı bozunur. Buna ek olarak kristallik miktarı polimerin uygulama alanını da etkilemektedir. Amorf polimerler aktif maddeler ile daha homojen bir yapı oluşturabildiği için ilaç salınım sistemlerinde kullanılırken, yarıkristalin polimerler daha iyi mekanik özelliklere sahip oldukları için yapısal destek gerektiren uygulamalarda kullanılmaktadır.



**Şekil 2. 5:** Laktat stereoizomerleri ve PLA 'in halka açılma polimerizasyonu [120].

PLA, PGA ve kopolimerleri, kemik doku tedavilerinde biyocam veya HA gibi seramiklerle kombinasyonları şeklinde kullanılmaktadır. Bu dolgular kemik hücrelerini kemik yenilenmesi için uyurabildikleri gibi kullanılan polimerin mekanik özelliklerini de geliştirirler. Biyoyumluluk, implantın kısa ve uzun vadeli başarısında önemli rol oynar. Biyobozunur malzeme uygulamalarında hem implantın hem de degradasyon ürünlerinin biyoyumlu olması ve toksik olmaması beklenmektedir. PLA, PGA ve kopolimerlerinin *in-vivo* ve *in-vitro* biyoyumluluğu üzerine birçok çalışma yapılmış ve raporlar yayınlanmıştır. PLA ve PGA implantların asidik degradasyon ürünleri üzerine tartışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte çalışmaların çoğunluğu, PLA ve PGA implantların vücut içerisinde basit reaksiyonlara neden oldukları ve bilinmeyen bir vücut reaksiyonuna kaynak teşkil etmediklerini göstermiştir [121].

#### 2.4.1.2.2. Polidioksanon (PDS)

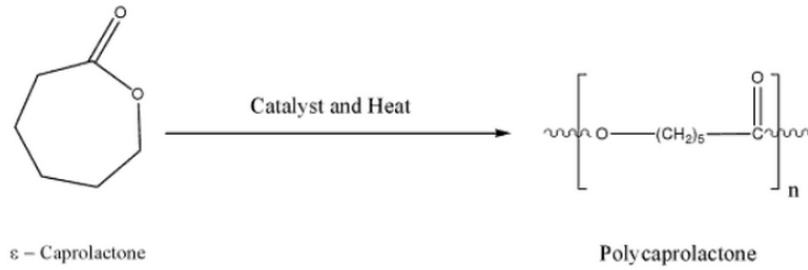
Polidioksanon, p-dioksanonun halka açılma polimerizasyonu ile elde edilir. Polidioksanonun degradasyon ürünleri toksik değildir. PLA ve PGA ile

karşılaştırıldığında, PDS daha elastiktir. PDS'in degradasyon hızı PGA'ye yakındır ve PLA'ye göre daha hızlıdır [114].

PDS genellikle diğer polimerlerle birlikte blend ya da kopolimer şeklinde kullanılır. PDS sütün ipliklerinin üretiminde kullanılmaktadır.

#### 2.4.1.2.3. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) biyobozunur ve biyouyumlu bir alifatik poliesterdir. Bu özelliklerinden dolayı birçok tedavi alanında kullanılmaktadır. PCL'un erime noktası 60°C, camsı geçiş sıcaklığı -60°C'dir ve oda sıcaklığında kauçuksu fazda bulunur. Termal stabilitesi yüksek olan PCL'un dekompozisyon sıcaklığı 350°C'dir. PCL,  $\epsilon$ -kaprolaktonun katalizör (kalay oktanoat vb.) varlığında gerçekleştirilen halka açılması polimerizasyonu ile elde edilir. Şekil-2.6 PCL'un halka açılması polimerizasyonunu şematize etmektedir.



**Şekil 2.6:** PCL'un halka açılması polimerizasyonu [122].

PCL, fizyolojik şartlar altında hidrolitik mekanizma üzerinden bozunurken, belirli şartlarda enzimatik yoldan bozunması da mümkündür [123, 124]. PCL'un bozunma hızı PLA ve PGA'den daha yavaştır. Bu nedenle uzun dönemli implantlar için kullanılmaları daha uygundur.

PCL diğer polimerlerle blend şeklinde kullanılabilirken,  $\epsilon$ -kaprolaktonun diğer monomerlerle kopolimerizasyonu da gerçekleştirilebilir.

#### 2.4.1.2.4. Poliüretanlar

Poliüretan (PU) terimi, zincirleri üzerinde üretan bağları bulunan çok geniş bir termoset polimer ailesini kapsamaktadır. Poliüretanlar diizosiyanat ve dioller arasındaki polimerleşme reaksiyonuyla elde edilirler. PU' lar düşük camsı geçiş sıcaklığına sahip yumuşak segment ile sert segmentlerin birleşiminden oluşan blok kopolimerler olarak sentezlenirler.



Poliüretanların biyoyumlu olmaları ve üstün mekanik özelliklere sahip olmaları bu malzemelerin biyomedikal alanında kullanımına olanak sağlar. Poliüretanların medikal uygulamaları 50'li yıllardaki göğüs protezleri ve kardiyovasküler cihazlarla başlar. Günümüzde, poliüretanlar kalp pili, kateter, yapay kalp ve kalp kapakçığı üretiminde kullanılırlar. Birçok araştırma grubu poliüretanların biyobozunurluk sorununu çözmek için malzeme kimyasını değiştirmek (monomer tipi ve oranı) ve katkılardan yararlanmak gibi stratejiler üzerinde çalışmaktadır. Biyobozunur poliüretanlar, degradasyon ürünleri toksik olmayan lizin-diizosiyanat ve heksametilen diizosiyanat gibi diizosiyanatlardan üretilirler. Doku mühendisliği alanında miyokardiyal ve vasküler dokuların tedavilerinde kullanılmak üzere biyobozunur poliüretanlar geliştirilmiştir [125, 126].

#### **2.4.1.2.5. Poli (orto-Ester)**

Poli(orto-ester) biyobozunur özelliğe sahip sentetik bir polimerdir. Bu polimerin bozunması yüzey erozyonu şeklinde gerçekleşir. Bozunma sırasında parçalara ayrılmak yerine gitgide incelirler [127]. Bu özellik ilaç salınım sistemleri için önemli olup ilaç salınımının daha kontrollü bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır.

Poli(orto ester)'in bozunması hidroliz şeklinde gerçekleşir ve bozunma hızı zamanla artar. Bozunma hızının artmasının nedeni bozunma sonucu açığa çıkan asidik ürünlerin bozunma reaksiyonu için katalizör olarak çalışmasıdır.

#### **2.4.1.2.6. Polianhidritler**

Polianhidritler mükemmel *in-vivo* biyoyumluluğa sahip polimerlerdir ve ilaç salınım sistemlerinde sıklıkla kullanılırlar [128]. Polianhidritler hidrofobik özellik sergilerler. Yapılarında kristalin faz içerirler ve erime noktaları 100°C civarındadır. Alifatik polianhidritler, diasitlerin dehidrasyon reaksiyonları ile sentezlenirler. Polimer yapısındaki anhidrit bağları kararsızdır, bu nedenle oldukça hızlı bozunurlar. Polianhidritlerin bozunma hızları hidrofobiklik özelliklerinin artırılmasıyla yavaşlatılabilmektedir. Bu polimerlerin bozunma mekanizmaları yüzey bozunması şeklinde gerçekleşir. Polianhidritler ışık altında çapraz bağlanma özellikleri sayesinde uygulanacakları bölgeye enjekte edilerek yerinde kütleme yapılabilirler.

Polianhidritler genellikle ortopedik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Ancak düşük mekanik özellikleri, fiziksel yüklenmenin fazla olduğu uygulamalarda kullanımlarını sınırlar. Polianhidritlerin mekanik özellikleri,

imidler ile çapraz bağlanarak geliştirilebilmektedir. Poli(anhidrit-ko-imid) kopolimerleri, imid bağlarının hidroliz olma yetenekleri sayesinde bozunabilmektedir. Poli(anhidrit-ko-imid) kopolimeri kullanılarak üretilen doku iskelelerinin yük taşıma kapasiteleri ortopedik uygulamalar için yeterlidir [129].

#### 2.4.1.3. Seramikler

Seramikler biyomedikal mühendisliğinde ve kemik doku onarımında sıklıkla kullanılan osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklere sahip malzemelerdir [130]. Seramik malzemeler doğal (koralina hidroksi apatit) veya sentetik (sentetik hidroksiapatit,  $\beta$ -trikalsiyum fosfat) orijinli olabilirler. Çeşitli çalışmalar, kemik doku tedavilerinde seramik kullanımının olumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir [131-133]. Buna karşılık seramik kullanımının bazı büyük eksiklikleri vardır. Kırılgan olmaları ve mekanik kararlılıklarının düşük olması bu malzemelerin büyük kemik hasarlarında kullanımlarını sınırlar. Osteoklastik aktiviteler gibi *in-vivo* faktörler nedeniyle seramiklerin bozunma ve çözünme hızlarının tahmini zordur. Seramiklerin diğer bir dezavantajı ise kalsiyum ve fosforun ekstraselüler matriks içerisindeki konsantrasyonlarını çok fazla arttırıp hücre ölümlerine sebebiyet verebilmeleridir [134].

Hidroksiapatit (HA),  $\beta$ -trikalsiyum fosfat ( $\beta$ -TCP) ve biyoaktif camlar kemik doku iskelesi üretiminde sıklıkla kullanılan biyoseramiklerdir.

HA seramiği, kemiğin mineral yapısına benzer bir kimyasal bileşime sahiptir. Yapılan çalışmalar HA seramiğinin biyouyumlu ve osteokondüktif özelliklere sahip olduğunu göstermiştir [130, 135, 136]. HA seramikleri genel olarak diş, kafatası ve ortopedik cerrahi uygulamalarında kullanılırlar [137-138]. HA seramiğinin kırılgan olması ve işlenebilirliğinin zor olması doku iskelesi üretiminde kullanımını sınırlamaktadır [139].

$\beta$ -TCP, Ca/P oranı 3/2 olan bir kalsiyum fosfat seramiğidir. Bu oran amorf kemiğin bileşim oranına benzemektedir. *In-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar  $\beta$ -TCP seramiğinin çok iyi biyouyumluluk ve osteokondüktif özelliklere sahip olduğunu göstermiştir [140, 141].  $\beta$ -TCP ortopedik ve dental uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [142, 143]. Ancak hızlı ve kontrolsüz bozunma, ve zayıf mekanik özellikleri  $\beta$ -TCP seramiğinin kullanımını sınırlamaktadır [144, 145].

Biyoaktif camlar sert ve yumuşak dokulara bağlanma özelliğine yani biyoaktiflik özelliğe sahiptirler [146]. Biyoaktif camların kemik dokuya bağlanmaları, oluşturdukları hidroksikarbonat apatit (HCA) yüzey tabakası sayesinde gerçekleşir [147]. Biyouyumlulukları ve osteokodüktiflikleri genel olarak kabul görmüştür [148,149]. Biyoaktif camlar dental, ortopedik, çene ve kulak burun boğaz uygulamalarında kullanılmaktadır [150].

#### 2.4.1.4. Grafen

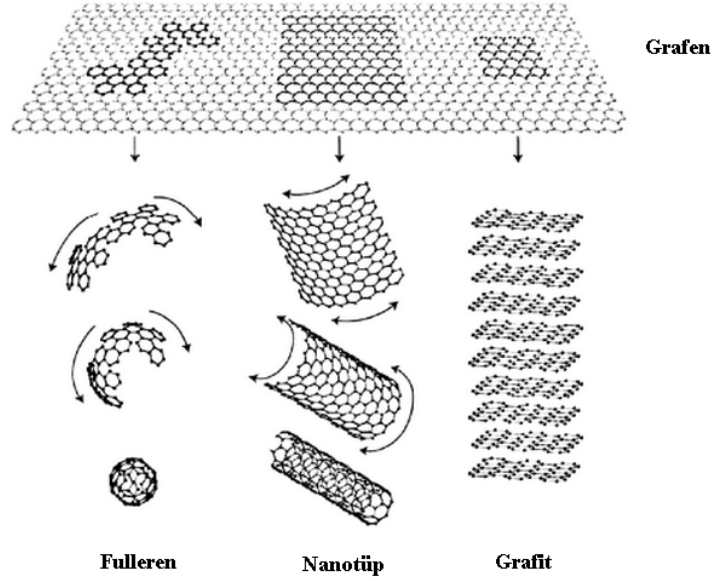
Grafen iki boyutlu (2B), bir atom kalınlığında, bal peteği şeklinde organize olmuş karbon kafes yapısıdır. Fulleren, karbon nanotüp ve grafitin temel bileşeni olan grafen çok iyi elektronik, mekanik, termal ve optik özelliklere sahiptir [151]. Şekil-2.7'de grafen ve diğer grafitik formlar şematize edilmiştir. Tekli grafen tabakalar ilk olarak 2004 yılında Andre Geim, Konstantin Novoselov ve arkadaşları tarafından Manchester Üniversitesi'nde elde edilmiştir [152]. Bununla birlikte grafenin geçmişi son 10 yılla sınırlı değildir ve yaklaşık 60 yıldır üzerinde çalışılmaktadır.

Grafen ismi ilk kez Mouras ve arkadaşları tarafından 1987 yılında, grafit tabakaları arasına giren değişik atom veya moleküllerden oluşan malzemeler anlamına gelen "Grafit İnterelasyon Bilşikleri" ismini tanımlamak için kullanılmıştır [153]. Yıllarca bu 2B malzemenin teorik olarak kararlı olmadığı, çok hızlı bir şekilde kendi çevresinde sarmallaşacağı ve büküleceği öngörüldüğünden elde edilemeyeceği düşünülmüştür [154]. Ancak 2004 yılından bu yana bir çok araştırma grubu bu sorunların tekli grafen tabakaların elde edilmesini engellemediğini kanıtlamıştır.

Günümüzde grafen ve grafen kökenli malzemeler değişik uygulamalar için ilginç ve çekici imkanlar sunmaktadır. Grafen üzerine yapılan çalışmaların sayısı ve kullanım alanları gitgide artmaktadır. Elektronik aletler, transistörler, piller, güneş panelleri ve biyolojik uygulamalar kullanım alanlarından bazılarıdır. Uygulama alanına göre grafenin üretim tekniği değiştirilebilir, örneğin elektronik aletlerde yüksek kalitede, saf ve hatasız yapı kullanılması zorunluymuşken [151, 152], biyolojik uygulamalarda kullanılan grafen bazlı kompozitler genellikle tek atom kalınlığında değildir [155-158].

Grafen diğer malzemelere göre üstün özelliklere sahiptir ve karakteristik özellikleri üretim prosesine bağlıdır. Grafenin en önemli özelliklerinden bir tanesi elektrik iletkenliğidir. Düşük yük taşıyıcı konsantrasyonunda ( $n=10^{11} \text{ cm}^{-2}$ ), oda sıcaklığında

yük transfer hareketliliği  $100\ 000\ \text{cm}^2\ \text{V}^{-1}\ \text{s}^{-1}$  değerinden büyüktür ve bu değer düşük sıcaklıkta,  $n=10^{12}\ \text{cm}^{-2}$  taşıyıcı konsantrasyonu için  $500\ 000\ \text{cm}^2\ \text{V}^{-1}\ \text{s}^{-1}$  'e kadar yükselir [159]. Tek tabakalı grafen için iletkenlik değeri  $6000\ \text{S/cm}$ ' dir [160]. Grafene ait bu iletkenlik değerleri silikonla karşılaştırıldığında daha yüksektir ve transistör alanında gelecek için umut verici olarak karşılanmaktadır.



**Şekil 2. 7:** Grafen ve grafitik formlar [151].

Elektronik ve fotonik endüstrilerde sadece elektrik iletkenliği değil termal iletkenlik de çok büyük öneme sahiptir. Bu durum ısıyı kolay ve verimli bir şekilde dağıtarak elektronik sistemin sıcaklığını istenilen değerlerde tutacak malzemelere olan ihtiyaçtan doğmaktadır. Karbon malzemeler ısı iletkenlerdir. Grafenin ısı iletkenliği  $5000\ \text{W}\ \text{m}^{-1}\ \text{K}^{-1}$  'dir ve bu değer karbon nanotüp, elmas ve amorf karbona ait ısı iletkenliği değerlerinden daha yüksektir [161].

Grafenin optik geçirgenliği teorik olarak hesaplanmış ve deneysel olarak (özel hazırlanmış grafen kristalleriyle) ölçülmüştür. Tek atom kalınlığındaki grafen tabakalar beyaz ışığın %2,3 'ünü absorblamaktadır. Eklenen her bir grafen tabakası opaklığı artırır [162, 163]. Ayrıca ışık geçirgenliği ölçümleri görünür bölgedeki opaklığın dalga boyundan bağımsız olduğunu göstermiştir. Grafenin optoelektronik özellikleri fotokimya, fotokataliz, enerji dönüşümü ve enerji depolama gibi alanlarda yeni uygulamalar için büyük şanslar doğurmaktadır [164, 165].

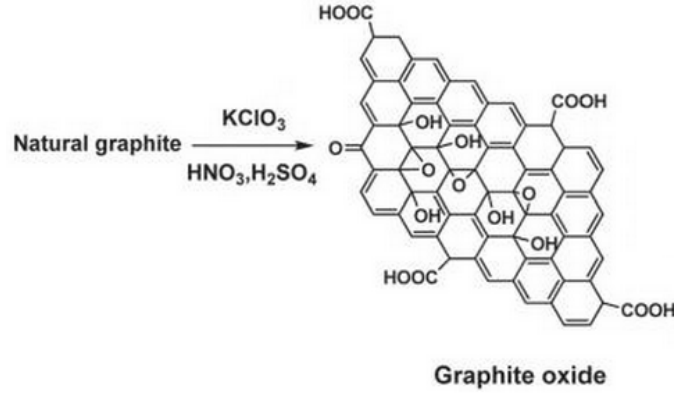
Üstün mekanik özellikleri, grafeni çok popüler bir malzeme haline getirmiştir. Atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ile yapılan çalışmalar  $42 \text{ N m}^{-1}$  'lık kopma mukavemeti,  $1 \text{ TPa}$  'lık elastik modülü ve  $130 \text{ GPa}$  'lık çekme mukavemeti değerleri ile grafenin test edilen en güçlü malzeme olduğunu göstermiştir [166]. Silikon veya silikon karbit için  $7 \text{ GPa}$ , bor nitrür nanotüp için  $33 \text{ GPa}$ , çok-duvarlı (multi-walled) karbon nanotüp için  $11-63 \text{ GPa}$  olan çekme mukavemeti değerleri ile karşılaştırıldığında grafene ait değerler üstünlüğü daha net anlaşılabilir. Elastiklik modülünü sertliğin bir ölçüsü olarak kabul edersek grafenin sertlik değeri, en yüksek sınıfta bulunan elmas ve tek-duvarlı (single-walled) karbon nanotüplerle kıyaslanabilir [167-171].

#### **2.4.1.4.1. Grafen Oksit**

Mekanik eksfoliasyon ile elde edilmesinden ve etkileyici özelliklerinin keşfedilmesinden [152] bugüne kadarki süreçte, grafenin çeşitli malzeme sistemleri içerisine dahil edildiği bir çok çalışma yapılmıştır [172-175]. Grafenin elde edilmesinde kullanılan en yaygın metot; grafitin oksidasyonu ile grafen oksit (GO) üretilmesi ve daha sonra grafen oksitin kimyasal olarak indirgenmesiyle grafen plakaların üretilmesidir [176]. Grafitin ilk oksidasyonu, 1859 yılında Brodie tarafından potasyum kloratın ( $\text{KClO}_3$ ) grafit ve dumanlı nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ) içeren karışıma eklenmesi ile yapılmıştır [177]. Staudemaier potasyum kloratı, reaksiyon sırasında ortama yavaş yavaş ekleyerek bu metodu bir adım ileri taşımıştır [178]. 1958 yılında Hummers ve Offeman potasyum permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) ve derişik sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) kullanarak bir başka oksidasyon reaksiyonu geliştirmiştir [179]. Hummers metodu günümüzde grafit oksidasyonu için kullanılan en yaygın metottur ve bu metot ile grafitin oksidasyonu istenilen derecede değiştirilebilmektedir. Şekil-2.8 Hummers metodu ile grafen oksit sentezini şematize etmektedir [180].

Grafen oksit, oksijen içeren çeşitli fonksiyonel gruplara (karboksil, hidroksil, epoksi) sahiptir. Yapı içerisinde bulunan bu oksijenli gruplar, grafen oksitin farklı moleküllerle fonksiyonlandırılmasına olanak sağlar. Farklı laboratuarlarda farklı yöntemlerle elde edilebilmesi ve karakterizasyonu için tek bir analitik yöntemin bulunmaması bugün grafen oksidin kesin moleküler yapısını anlamamızı engeller. Yapısı hakkında tartışmalar olmasına rağmen, karboksil gruplarının bazal düzlemin

kenarlarında, hidroksil ve epoksi gruplarının ise bazal düzlemin içinde yer aldığı üzerine uzlaşma sağlanmış gibi görünmektedir [181].



**Şekil 2. 8:** Hummers metodu ile GO sentezi [182].

Grafen ve türevleri nanoelektronik, nanokompozit, enerji depolama, alan etkili transistör (FET), organik ışık emisyon diotları (OLED), sensörler, kataliz ve biyomedikal gibi bir çok alan için olağanüstü potansiyele sahiptirler [183]. Umut verici özelliklerinden dolayı karbon nanotüp, grafen, grafen oksit, nanoelmas ve fulleren gibi karbon nanoyapılar son yıllarda yapılan çalışmaların odak noktası olmuştur. Özellikle grafen oksit, mekanik özellikleri (yüksek Young modülü, sertlik ve esneklik) ve diğer nano yapılara göre düşük maliyetli olması nedeniyle öne çıkmaktadır [184]. Grafenin su içerisindeki stabil dispersiyonu hidrofobik olmasından dolayı ancak uygun yüzey aktif madde varlığında sağlanabilmektedir [185]. Oksijenli grupların varlığı grafen oksidi hidrofilik yapar ve polar çözücülerde dağılabilen bir malzeme haline getirir [184].

Yüksek mekanik dayanımı, geniş yüzey alanı ( $2600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), yüksek hidrofiliklik, iyi biyouyumluluk ve biyostabilite özellikleriyle grafen oksit biyokompozitler için ideal takviye edici dolgu olabilir [186,187]. Grafen bazlı nanokompozitlerin fizikokimyasal özellikleri grafen tabakalarının polimer matriksi içindeki dağılımına ve grafen tabakaları ile polimer matriks arasında oluşan etkileşimlere bağlıdır. Saf grafen organik polimerlerle uyumlu değildir ve homojen kompozitler oluşturamaz. Buna karşılık grafen oksit tabakaları organik polimerlerle daha uyumludur ve nanokompozitlerde dolgu olarak kullanılmaktadır. Grafen iletken olmasına rağmen grafen oksit yalıtkandır, bu nedenle GO iletken nano kompozit sentezi için uygun değildir [188].

Yapılan son çalışmalarda grafen ve grafen oksit içeren doku iskelelerinin mezankimal hücre ve osteoblast hücrelerin yapışmasına katkıda bulunarak doku yenilenmesini olumlu yönde etkilediği gözlenmiştir [189]. Grafen ve grafen türevlerinin olumsuz biyolojik etkileri ile alakalı çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların çoğunluğu konsantrasyon bağlantılı toksiklikle alakalıdır [190]. Birçok çalışmada polimerlerin az miktarda GO ve grafen nano plakaları ile takviye edilmesi verimli sonuçlar vermiştir [191-193]. Grafen nano plakaların ve grafen oksidin sentezi sırasında, karbon nano tüplerde olduğu gibi metal katalizörleri kullanılmaz. Bu nedenle metal kalıntıları kaynaklı sitotoksikite ve enflamasyon, grafen oksit ve grafen nano plakaları için söz konusu değildir.

#### **2.4.2. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri**

Vücut içerisinde hücreler ve dokular üç boyutlu yapıda organize olmuşlardır. Doku iskeleleri bu fonksiyonel dokuların tasarımında kullanılırlar. Hücre dağılımını ve hücrelerin üç boyutlu şekilde çoğalmalarını kolaylaştırmak amacıyla kullanılan doku iskeleleri değişik metotlarla üretilebilirler. Yaygın olarak kullanılan yöntemler bu bölümde incelenecektir.

##### **2.4.2.1. Çözücü Dökme**

Doku iskelesi hazırlanmasında kullanılan çözücü dökme tekniği basit, kolay ve pahalı olmayan bir yöntemdir. Bu teknik bir miktar çözücünün buharlaştırılması temeline dayanır ve büyük ekipmanlara ihtiyaç duymaz. Genel olarak iki şekilde uygulanır. İlk yöntemde; kalıp, polimer çözeltisine daldırılır ve çözelti çekilene kadar beklenir. Çözücü tamamen buharlaştıktan sonra polimerik membran elde edilir. Diğer yöntemde polimer çözeltisi kalıba dökülür ve çözücü buharlaşana kadar beklenir, kalıba yapışmış durumda bulunan polimerik membran kalıptan ayrılır [194]. Çözücü dökme tekniğinin temel eksikliklerinden bir tanesi toksik çözücü kalıntılarıdır. Bu kalıntılar proteinleri ve diğer çözücüleri etkileyebilir. Çözücü kalıntılarının doku iskelesinden uzaklaştırılması için doku iskeleleri vakum altında tamamen kurutulmalıdır [195].

##### **2.4.2.2. Partikül Uzaklaştırma**

Partikül uzaklaştırma, doku iskelesi üretilmesinde sıklıkla kullanılan popüler bir yöntemdir [196, 197]. Bu teknikle gözenekli doku iskeleleri üretimi amaçlanmaktadır.

Gözenek ve kanallar tuz, mum, şeker gibi porojen maddelerin kullanımı ile sağlanır. Bu yöntemde öncelikle istenilen gözenek büyüklüğüne özdeş büyüklükteki porojen tanecikleri polimer çözültisi ile karıştırılır. Karışım bir kalıbın içerisine dökülür. Çözücünün buharlaştırılmasından sonra oluşan polimer/porojen kompoziti, porojen maddeyi çözebilen bir çözücü içerisine daldırılır. Porojen taneciklerinin yapıdan uzaklaştırılmasıyla gözenekli doku iskelesi elde edilmiş olur.

Partikül uzaklaştırma, uygulaması kolay bir prosestir. Basitçe kalıp geometrisinin değiştirilmesi ile çeşitli şekillerde doku iskeleleri üretilebilir. Gözenek sayısı ve gözenek boyutu kullanılan porojen ile kontrol edilebilir [198]. Kritik değişkenler olan gözenek şekli ve gözenekler arası bağlantı bu yöntem ile kontrol edilemez. Çok az miktarda polimere ihtiyaç duyulması bu tekniğin sağladığı en önemli avantajlardan bir tanesidir.

### **2.4.2.3. Gaz Köpürtme**

Üretim tekniklerinden birçoğu organik çözücülere ve yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyar. Proses tamamlandıktan sonra ortamda kalan kalıntılar, hücrelere ve yakındaki dokulara zarar verebileceği gibi, doku iskelesi ile birlikte kullanılan biyolojik aktif moleküllerin yapısını da bozabilir. Gaz köpürtme yöntemi organik çözücülere ve yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duymaz. Bu teknikte gözenekli doku iskelesi üretmek için yüksek basınçlı (süperkritik bölgede), polimer içerisinde çözünebilir inert gazlar ( $N_2$ ,  $CO_2$ ) kullanılır [199-201]. Doku iskelesini porozitesi ve gözenek yapısı polimer içerisinde çözünen gaz miktarına bağlıdır. Gözenekli polimer yapı, doyana kadar yüksek basınçlı gaza maruz bırakılır [202]. Bu şartlar altında gaz kararsız haldedir ve polimerle aralarında faz ayrımı oluşur. Gaz molekülleri serbest enerjiiyi minimize etmek için kümeleşir ve böylece gözenek nükleasyonu başlar. Oluşan gözenekler polimerik hacmi oldukça yükseltirken, polimerin yoğunluğu düşer. Köpürtme işlemi tamamlandıktan sonra gözenekli üç boyutlu yapı elde edilir.

Çözücüye ihtiyaç duymaması, proses sonrası kalıntı riskini elimine etmesi ve düşük proses sıcaklıklarında uygulanması yöntemin sağladığı avantajlardan bazıdır. Bu yöntemle açık gözenek morfolojisi elde etmek mümkündür. Bununla birlikte genellikle küçük boyutlu gözenekler elde edilmektedir [203-205]. Doku iskelesinin porozitesi tuz, şeker ve mum gibi porojenler kullanılarak kontrol edilebilir. Polimer/porojen karışımı doyana kadar yüksek basınçlı karbondioksitle muamele



edilir. Köpürtme işlemi tamamlandıktan sonra porojen uzaklaştırılmasıyla gözenekler arası bağlantılara sahip doku iskeleleri elde edilir [206].

#### **2.4.2.4. Faz Ayrımı**

Faz ayrımı tekniğinde homojen bir polimer çözeltisi sıcaklık değişiminden yararlanılarak, düşük polimer konsantrasyonlu (polimer yalın faz) ve yüksek polimer konsantrasyonlu (polimer zengin faz) olarak iki faza ayrılır [194]. Faz ayrımı, homojen polimer çözeltisinin termodinamik açıdan kararsız olduğu ve sistemin çoklu faz bölgelerine ayrılma eğiliminin bulunduğu belirli bir sıcaklıkta gerçekleşir [207, 208]. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra polimer-zengin-faz katılarak matrisi oluştururken, polimer-yalın-faz yapı içerisindeki gözenekleri oluşturur. Faz ayrımı sıvı-sıvı faz ayrımı ve katı-sıvı faz ayrımı olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Katı-sıvı faz ayrımı uygulaması, sıcaklığın düşürülmesi ile çözücünün kristalizasyonunu sağlayıp, daha sonra bu çözücü kristallerinin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla gözeneklerin elde edilmesine dayanır. Sıvı-sıvı faz ayrımı prosesinde polimer çözeltileri kritik bir üst sıcaklıkta iki fazlı sürekli bir yapı oluştururlar [209, 210].

Faz ayrımı tekniğinin avantajı gözenek morfolojisinin kontrolü için diğer üretim teknikleri (partikül yıkama, hızlı prototip) ile kolaylıkla birleştirilebilmesidir [211].

#### **2.4.2.5. Elektro-eğirme**

Elektro eğirme tekniği kullanılarak çapı mikrometre ile nanometre aralığında değişen fiberler elde etmek mümkündür [212]. Elektro-eğirme tekniğinde bir şırınga pompasına, yüksek voltaj kaynağına ve bir kolektöre ihtiyaç duyulur. İlk olarak polimer çözeltisi veya eriyiği bir kapiler tüpe doldurulur ve daha sonra bu kapiler tüpe yüksek voltaj uygulanır. Polimer kapiler tüpün ucunda yüzey gerilimi sayesinde tutunmaktadır. Yüzey geriliminin tam tersi yönünde uygulanan elektrik alan karşılıklı yük itmesini oluşturur. Elektrik alan şiddeti belirli bir seviyeye ulaştığında yük itimi yüzey gerilimini yenerek kapiler tübün ucunda bir jet oluşturur. Son olarak kapilerden ayrılan polimer çözeltisi ve eriyik birbirini iter. Jet kolektöre ulaşana kadar çözücü buharlaşır ve fiberler oluşur. Fiber kalınlığı çözeltinin viskozitesi, iletkenliği, yüzey gerilimi, kapilerin hidrostatik basıncı, elektrik alan şiddeti ve kolektörün uzaklığı ile istenilen düzeye getirilebilir [213].

Elektro-eğirme tekniğinin en büyük avantajı elde edilen doku iskelesinin esnek ve kararlı fiberlerden oluşmasıdır. Bu yöntemle elde edilen fiberlerin doku iskelesi içerisinde yönlendirmeleri doku oluşumu sırasında hücrelerin ve dokuların da yönlendirmelerini indükler. Ancak üretim sırasında fiberlerin kırılma riski bu yöntemin dezavantajıdır. Bu kırılmalar üretilen doku iskelesinin kalitesini etkileyebilir [214].

#### **2.4.2.6. Dondurarak Kurutma**

Dondurarak kurutma süblimleşme prensibine dayanır. Polimer istenilen konsantrasyonda bir çözücü içerisinde çözülür. Çözelti dondurulur ve çözücünün liyofilizasyon ile yüksek vakum altında uzaklaştırılmasıyla yüksek poroziteye ve gözenekler arası bağlantılara sahip doku iskelesi elde edilir [215]. Polimer konsantrasyonu, soğutma sıcaklığı ve soğutma hızı gibi parametreleri değiştirilerek porozite, gözenek boyutu ve mekanik özellikler kontrol edilebilir [216]. Yüksek sıcaklık ve yıkama basamaklarına ihtiyacı olmaması bu tekniğin avantajlarıdır. Küçük gözenek boyutu ve uzun proses süresi ise dezavantajlarıdır [217].

#### **2.4.2.7. Eriyik Bazlı Teknolojiler**

Doku iskelesi üretiminde kullanılan eriyik bazlı teknolojiler ekstrüzyon ve enjeksiyonla kalıplamadır [218, 219]. Aslında bu tekniklerin genel kullanım amaçları doku iskelesi üretmek olmamasına rağmen günümüzde doku mühendisliği uygulamalarında alternatif olarak kullanılmaktadır. Eriyik bazlı teknolojiler ham polimerin sitrik asit bazlı şişirme ajanlarıyla karıştırılması temeline dayanır. Karışım, hazırlandıktan sonra ekstrüzyon veya enjeksiyon vasıtasıyla kalıp içerisine doldurulur. Proses sırasında sitrik asidin degradasyonu sonucu su ve karbon dioksit açığa çıkar. Bu degradasyon ürünleri polimer matriks içerisinde gözeneklerin oluşmasını sağlar. Bu yöntemle üretilen doku iskelelerinin mekanik özellikleri geleneksel yöntemlerle üretilenlere göre yüksektir ve trabeküler kemiğe ait mekanik değerlere benzerdir. Bu yöntemin dezavantajı gözenek dağılımı kontrolünün optimize edilememesidir [220-222].

#### **2.4.2.8. Fiber Bağlama**

Fiber bağlama yöntemiyle üretilmiş doku iskeleleri, birbirinden ayrı fiberlerin çeşitli gözenek boyutlarına sahip bir desen şeklinde dokunması yada örülmesiyle elde edilirler. Bu yöntem doku iskelesi üretiminde yaygın olarak kullanılan tekniklerden

bir tanesidir ve dokuma, örme, fiziksel bağlama gibi farklı uygulamaları vardır [223]. Fiber bağlama yöntemi ile üretilen doku iskeleleri geniş yüzey alanına ve gözenekler arası bağlantılara sahiptir. Bu bağlantılar hücrelerin doku iskelesine yapışmasına izin verir ve ECM 'in difüzyonunu kolaylaştırır. Bu yöntemin dezavantajı ise porozite ve toksik çözücü kalıntılarının kontrol edilememesidir.

#### **2.4.2.9. Hızlı Prototipleme**

Hızlı prototipleme (RP) katı serbest şekillendirme (solid free form) olarak da bilinir. Bu teknik bilgisayar kontrollü bir üretim şeklidir ve diğer doku iskelesi üretim tekniklerinden daha ileri bir yöntemdir. Hızlı prototipleme ile çok hızlı bir şekilde üç boyutlu objeler üretilebilmektedir. Bu yöntemin uygulamalarında genellikle bilgisayar destekli tasarım (CAD) yazılımlarından yararlanır. Hızlı prototipleme makinesi tabandan başlayarak katman katman polimer tabakalarını inşa ederek doku iskelesini oluşturur [224, 225].

Hızlı prototipleme günümüzde doku iskelesi üretiminde kullanılan verimli bir yöntemdir. Bu tekniğin avantajı doku iskelelerinin mimari ve bileşen açısından tekrar aynı şekilde üretilebilmesine olanak sağlamasıdır. Diğer yöntemlere göre avantajı ise doku iskelesinin büyüklüğünün, şeklinin, gözenekler arası bağlantıların, dallanmaların, geometri ve yönlenmelerin kontrol altında olmasıdır. Ayrıca malzeme ve dizayn varyasyonları yapılarak doku iskelesine ait mekanik özellikler, biyolojik etkiler ve degradasyon kinetiği kontrol altına alınabilmektedir [226, 227].

Hızlı prototipleme yöntemi, görüntüleme tekniği ile kolaylıkla entegre olabilir. Bu sayede doku mühendisliğinin özel uygulamaları için ve hastaların ihtiyaçlarına göre dizayn edilmiş doku iskeleleri üretilebilmektedir. Hızlı prototipleme tekniğinin önemli eksiklikleri ise mevcut sistemlerin düşük çözünürlükte olması ve kullanılabilen polimerik malzeme sayısının sınırlı olmasıdır [195].



### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Kullanılan Malzemeler**

Doku iskelesi içerisinde dolgu olarak kullanılan GO'nin sentezi daha önce gerçekleştirilmiş ve temin edildiği şekilde kullanılmıştır [228]. Doku iskelelerinin biyobozunur polimer fazı PCL (Purac, Hollanda, Mw=200 kDa) ve PLLA (Purac, Hollanda, Mw=360 kDa) ile hazırlanmıştır. Porojen olarak NaCl kristalleri (Merck, Darmstadt, Almanya), çözücü olarak 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP) (Merck, Darmstadt, Almanya) ve kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır.

#### **3.2. GO/Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması**

##### **3.2.1. GO-HF/Polimer Çözeltisinin Hazırlanması**

Çalışmanın bu aşamasında homojen GO/polimer çözeltilerinin hazırlanması amaçlandı. Doku iskelesinin bozunma hızını kontrol altında tutabilmek ve mukavemetini geliştirmek amacıyla kopolimer yerine farklı molekül ağırlıklarına sahip iki polimerin karışımı kullanıldı. Daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda, bozunma hızları ve mekanik mukavemetleri göz önünde bulundurularak PLLA/PCL oranı 50/50 (w/w) seçildi [229]. GO ilavesinin doku iskelesinin fiziksel özellikleri üzerindeki etkisini incelemek için sırasıyla GO/polimer oranı %2-5-7 (w/w) olan çözeltiler hazırlandı. Belirlenen miktarda GO tartıldı ve 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP) içerisinde ultrasonikasyonla tamamen dispers edildi. Polimer/çözücü oranı %13 (w/v) olacak şekilde PLLA/PCL karışımı GO çözeltisine eklendi. Çözelti 18 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak polimerlerin çözünmesi sağlandı.

##### **3.2.2. Liyofilize GO/Polimer Çözeltisinin Hazırlanması**

GO tabakalarının birbirinden ayrılması ile hem kloroform içerisinde dispersiyonun artması hem de GO 'in polimer çözeltisi içerisinde homojen olarak dağılmasını sağlamak amacıyla dondurarak kurutma tekniği uygulanmıştır. Grafen oksidin, GO/su oranı %5 (w/v) olacak şekilde sulu çözeltisi hazırlandı. Çözelti -20°C'de 8

saat süre ile donduruldu. Dondurulmuş çözelti liyofilizatör (FD) cihazında (Freezone 1, Labconco, USA) 48 saat süre ile liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu.

Dondurarak kurutulmuş GO (GO-FD)'in polimerik yapı üzerindeki etkisini incelemek için sırasıyla GO-FD/polimer oranı %2-5-7 (w/w) olan çözeltiler hazırlandı. Belirlenen miktarda GO-FD tartıldı ve ultrasonikasyon işlemi ile kloroform içerisinde dispers edildi. GO-FD/polimer çözeltileri, GO-HF/polimer çözeltilerinin hazırlanışında olduğu gibi polimer/çözücü oranı %13 (w/v) ve PLLA/PCL oranı 50/50 olacak şekilde aynı prosedürle hazırlandı.

### **3.2.3. Gözenekli Doku İskelelerinin Hazırlanması**

Gözenekli yapının elde edilmesi için partikül uzaklaştırma yöntemi ve oluşan gözenekler arasındaki bağlantıları elde etmek için gaz köpürtme (süperkritik karbondioksit) yöntemi sırasıyla uygulandı.

Hazırlanan polimer çözeltisinin içerisine 150-250 µm boyutuna sahip NaCl tanecikleri polimer/tuz oranı 11/10 (w/w) şekilde eklendi ve karıştırıldı. Karışım 8 mm çapa sahip kalıplara dökülerek kalıplandı. Çözücünün tamamen uzaklaşması için 3 gün oda sıcaklığında vakum altında kurutuldu. Kurumuş haldeki polimerik doku iskeleleri kalıptan çıkarıldıktan sonra içerisindeki tuz taneciklerinin uzaklaştırılması için 4 gün distile su içinde bekletildi. Tuz taneciklerinden arındırılan doku iskeleleri 37°C sıcaklıkta 2 gün etüvde kurutuldu. Gözenekler arası bağlantıların geliştirilmesi için süperkritik karbondioksit metodu uygulandı. Bu metot ile aynı zamanda katalizör, monomer gibi polimerizasyon kalıntılarının uzaklaştırılması sağlandı. Doku iskeleleri reaktör içine yerleştirilerek 35°C 'de 2000 psi basınçla 10 dakika süreyle karbondioksit gazı ile muamele edildi. Reaktörün valflerinin açılmasıyla gaz basıncı düşürüldü ve gazın ortamı terketmesiyle birlikte doku iskelesi içerisinde yeni gözenekler oluştu.

Aynı işlemler GO içermeyen kontrol amaçlı hazırlanan doku iskeleleri için de tekrarlandı.

### **3.3. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu**

#### **3.3.1. Doku iskelelerinin morfolojisi**

##### **3.3.1.1. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Micro-CT)**

Doku iskelelerinin morfolojik yapısı mikro-bilgisayarlı tomografi (micro-CT, 1072 scanner; SkyScan, Kontich, Belçika) ile incelendi. X-ray tüpünün tarama parametreleri 45 keV/183 µm olarak belirlendi. Kesit yüksekliği 8,79 µm ve kesit sayısı 175 olacak şekilde taramalar gerçekleştirildi. Micro-CT analizi ile gözenek boyutu, porozite, gözenekler arası bağlantı ve duvar kalınlıkları incelendi.

##### **3.3.1.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)**

Doku iskelelerinin gözenek yapısı ve GO' in polimer matriks içerisindeki dağılımı taramalı elektron mikroskopu (SEM) (XL30 ESEM-FEG, FEI-Philips, Hollanda) ile incelendi. Doku iskelesi örnekleri SEM karakterizasyonundan önce sıvı azotla dondurulduktan sonra kırılarak kesitleri platin ile ince bir tabaka şeklinde kaplandı. Büyütme oranı x50-10000 aralığında olan SEM görüntüleri alındı.

#### **3.3.2. Fiziksel Yapı ve Kristalinite**

##### **3.3.2.1. X-Işını Difraksiyonu (XRD)**

GO tabakalar arası uzaklığın ölçümü, PLLA ve PCL kristal yapı özelliklerinin incelenmesi X-ışını difraksiyonu (XRD) (Rigaku D/Max Ultimate difraktometre, CuK $\alpha$  ışınması,  $\lambda=1,54 \text{ \AA}$ , Rigaku, Tokyo, Japan) tekniği ile 0,2°/dakika tarama hızında (0°-50° aralığında) 40 mA ve 40 kV koşullarında gerçekleştirildi.

##### **3.3.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)**

Polimerik doku iskelesi örneklerinin kristalizasyon ve erime davranışları diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) (Seiko – SII DSC 7020, Tokyo, Japonya) ile incelendi. Analizler, 10°C /dakika ısıtma hızı ve 100°C /dakika soğutma hızı kullanılarak -20°C ile 200°C aralığında üç basamaklı (ısıtma-soğutma-ısıtma) olarak azot gazı altında gerçekleştirildi.

##### **3.3.2.3. Mekanik Testler**

Hazırlanan doku iskelelerinin mekanik özellikleri universal test cihazı ( Zwick/Roell, Almanya) ve 50N yük hücresi kullanılarak incelendi. Basma testi oda sıcaklığında, 2 mm/dakika basma hızıyla gerçekleştirildi. Test örneklerinin çap/yükseklik oranı 1:1 olarak ayarlandı. TestXexpert-II programı kullanılarak elde edilen

gerilim-deformasyon eğrileri ile basma modülleri (E) ve %60 deformatasyondaki maksimum kuvvet (Fmax) değerleri, kontrol numunesi ve GO'in dolgulama derecesi açısından değerlendirildi.



#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kemik, iskelet sisteminin temel bileşenidir. Sert ve güçlü yapısı nedeniyle, yumuşak dokuların tutanabileceği ve hareket sırasında bütünlüklerini koruyabilecekleri bir destek rolü görür. Kemiğin vücut içindeki fonksiyonları 4 ana grupta toplanabilir: mekanik destek sağlamak (örn. kaburgalar), harekete izin vermek (örn. uzun kemikler), organları korumak (örn. kafatası) ve kalsiyum, fosfor ve diğer bazı iyonlar için rezervuar görevi yaparak (vücut kalsiyumunun %99'u kemiklerde bulunur) vücut sıvılarının iyonik dengesini korumak (homeostaz).

Mühendislik yaklaşımı ile kemik dokusunun rejenerasyonu için gerekli olan temel bileşenlerden biri hücrelerin tutunması, göç etmesi, proliferasyonu ve farklılaşmasına öncülük ederek üç boyutlu doku rejenerasyonunun oluşmasını sağlayan bir doku iskelesidir. Fabrikasyon kolaylıkları, degradasyon zamanı kontrolü ve kolay elde edilmeleri nedeniyle sentetik polimerlerin doku iskelesi olarak kullanımı oldukça yaygındır. Özellikle PLA, PGA ve bunların kopolimerleri ameliyat iplikleri ve bazı medikal implantlar için FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) onayına sahip olduğundan doku mühendisliğinde de doku iskelesi yapımında sıklıkla tercih edilmektedir [8, 71]. Ancak hücre etkileşimlerinin iyi olmaması ve çok gözenekli yapılarda mekanik dayanımlarının oldukça azalması nedeniyle, bu polimerin seramik malzemeler ile kompozitlerinden yapılan doku iskelelerinin kullanımı giderek artış göstermektedir.

Karbon temelli nanomalzemeler sahip oldukları eşsiz kimyasal, elektriksel ve mekanik özellikler nedeniyle son yıllarda doku mühendisliğinde hızla kullanım alanı bulmuştur. Özellikle grafen ve türevleri; yüzeylerinin kolaylıkla fonksiyonlandırılarak çok değişik özellikler kazandırılabilmesi, yüksek mekanik dayanıklılık ve maksimum yüzey/hacim oranı gibi öne çıkan özellikleri ile doku iskelesi yapımı için diğer pahalı ve eldesi güç malzemelere göre çok iyi bir alternatif olarak gözükmektedir. Bunun yanısıra, grafenin son birkaç yıl içinde yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkan diğer önemli bir özelliği olan hücre büyüme ve farklılaşmasını arttırma yeteneği de büyük bir avantajdır [230-233]. Sunulan tez kapsamında, grafenin bu eşsiz özelliklerinin doku mühendisliği uygulamalarında en çok tercih edilen polimerler olan biyobozunur polikaprolakton ve polilaktat ile

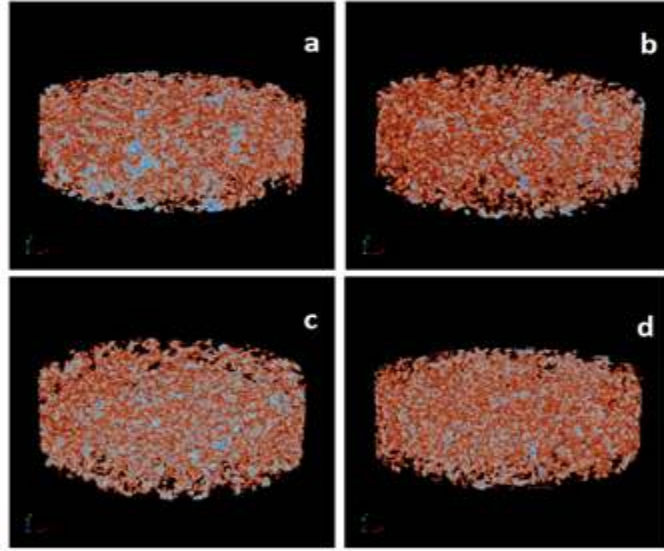
hazırlanacak kompozitlerinden, kemik doku onarımı/yenilenmesine yönelik üç boyutlu ve gözenekli doku iskeleleri hazırlanması hedeflenmiştir. Grafenin polimer yapısına eklenmesinin doku iskelelerinin fiziksel yapısına etkileri çeşitli analizler yapılarak incelenmiştir.

#### **4.1. Doku iskelelerinin morfolojisi**

Doku iskelesi dizaynında gözenek yapısı, boyutu ve gözeneklerin birbirleriyle yüksek oranda bağlantılı olması, oluşan yeni dokuda damarlaştırmanın sağlanması bakımından özel bir önem taşımaktadır [55, 234]. Bu gözenekler sayesinde doku iskelesi üzerinde büyütülen veya implantasyondan sonra çevre dokulardan buraya göç eden hücrelerin oksijen ve besin ihtiyaçları karşılanırken, aynı zamanda hücre atıkları da ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılır. Bu tez kapsamında hazırlanan kompozit doku iskelelerinin morfolojisi de mikro-CT ve SEM kullanılarak analiz edilmiştir.

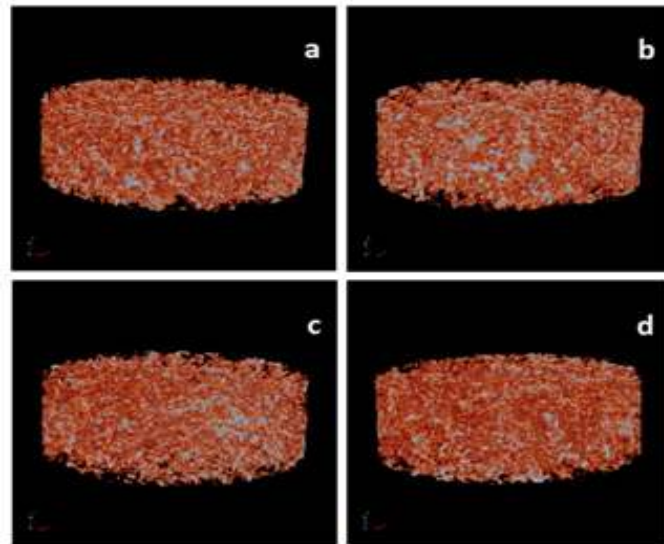
##### **4.1.1. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Micro-CT)**

Grafen oksitin, PLLA/PCL polimer karışımı ile integrasyonunu sağlamak amacıyla iki değişik metot kullanılmıştır. Her iki metot ile hazırlanan grafen oksitin fiziksel yapı olarak birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Bu farklılık ve sebepleri Bölüm 4.2.1’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Liyofilizasyon ve HFIP ekstraksiyonu ile hazırlanan GO’in kullanıldığı doku iskelelerinin 3 boyutlu görüntüleri sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. Hazırlama yöntemi nedeniyle grafen oksitte meydana gelen fiziksel farklılıkların doku iskelelerinin morfolojisine de yansıdığı görülmektedir. Değişik oranlarda liyofilize GO (GO-FD) katılan doku iskeleleri, gözenek yapısı bakımından saçaksı bir görüntüdedir. Bu durumun artan GO-FD miktarı ile artış gösterdiği gözlemlenmiştir.



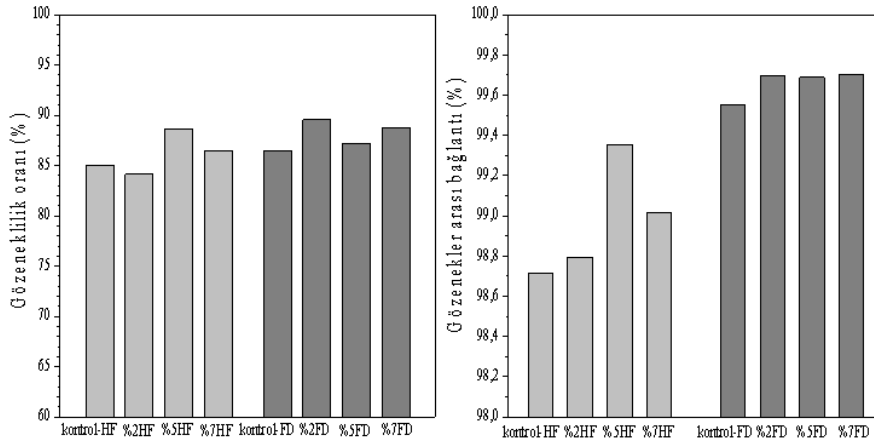
**Şekil 4. 1:** Liyofilize grafen oksit ile desteklenmiş PLLA/PCL doku iskelelerinin mikro-CT görüntüleri a) GO içermeyen b) %2 GO-FD, c) %5 GO-FD, d) %7 GO-FD, içeren kloroform ile hazırlanmış doku iskelesi.

HFIP ile ekstrakte edilen ve daha sonra aynı çözücü içinde dağıtılan GO ile bu dispersiyona eklenmek suretiyle hazırlanan PLLA/PCL doku iskelelerinin 3 boyutlu mikro-CT görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen doku iskelelerinin daha kompakt bir yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin GO’in HFIP içerisinde çok iyi dağılarak, daha sonra eklenen polimerler ile homojen ve viskoz bir çözelti oluşturabilmesi olduğu söylenebilir.



**Şekil 4. 2:** HPIF ekstrakte grafen oksit ile desteklenmiş PLLA/PCL doku iskelelerinin mikro-CT görüntüleri a) GO içermeyen b) %2 GO-HF, c) %5 GO-HF, d) %7 GO-HF içeren HFIP ile hazırlanmış doku iskelesi.

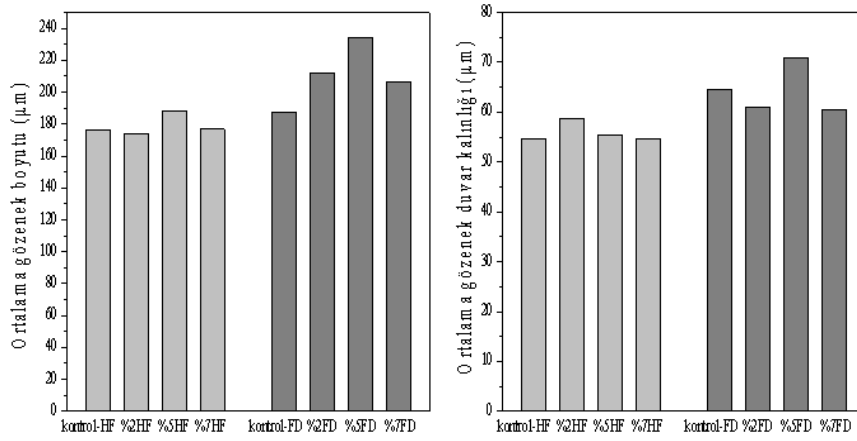
Grafen oksit kullanımının, kullanılan grafen oksitin hazırlanma yönteminin ve oranının doku iskelelerinin gözenekliliği üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı yapılan mikro-CT analizleri sonucu bulunmuştur (Şekil 4.3, sağdaki grafik). Gözeneklilik yüzdesi GO-FD ile hazırlanan kompozitlerde %86.5-89.5 arasında iken GO-HF ile hazırlanan kompozitlerde bu değer %84.1-88.6 aralığında ölçülmüştür. Benzer şekilde, GO-FD ile hazırlanan doku iskelelerinin gözenekler arası bağlantı yüzdesi GO-HF ile hazırlanan yapılara göre sadece yaklaşık %1 fark göstermiştir. Bu oran GO-FD'li doku iskeleleri için ortalama %99.7 iken, GO-HF'li doku iskeleleri için ortalama %99.0 civarındadır. Her iki özellik için ölçülen değerler oldukça yüksektir ve kemik doku iskelesi için büyük bir avantajdır.



**Şekil 4. 3:** Doku iskelelerinin mikro-CT ile ölçülen ortalama gözeneklilik oranı (sol) ve gözenekler arası bağlantı yüzdesi (sağ).

Kemik dokusu rejenerasyonunda kullanılacak olan destek matriksinin gözenek boyutuna ilişkin çok çeşitli varsayımlar ve çalışmalar vardır. Klawitter ve Hulbert hazırladıkları minimum 100µm gözenek boyutuna sahip seramik yapılarda kemik dokusunun büyümesinin gerçekleştiğini rapor etmişlerdir [235]. Simske ve ark. da benzer sonuçlara ulaşmıştır [236]. Buna karşılık, Italia ve ark. 50µm gözenekli doku iskelelerinde bile kemik dokusunun büyüebildiğini göstermişlerdir [237]. 3D fabrikasyon tekniği ile üretilen 15-40µm aralığında gözeneklere sahip doku iskelelerinde de kemik doku büyümesinin mümkün olabileceği savunulmuştur[238]. Bu tez çalışmasında hazırlanan doku iskelelerinin ortalama gözenek boyutu ise gözeneklilik ve gözenekler arası bağlantı özelliklerinden farklı olarak GO'in hazırlanma yönteminden etkilenmiştir. Şekil 4.4'de değişik oranlarda GO-FD ve GO-HF katılarak hazırlanan doku iskelelerinin ortalama gözenek boyutları ve ortalama

gözenek duvar kalınlıkları verilmiştir. GO-FD için ortalama gözenek boyutu 204-234 $\mu\text{m}$  arasında değişirken, bu değerler GO-HF'li matrikslerde ortalama 174-188 $\mu\text{m}$  aralığındadır. Her iki yöntemde de kullanılan GO yüzdesinin kendi türünde gözenek boyutunu fazla etkilemediği bulunmuştur. Sonuç olarak iki değişik yöntemle modifiye edilmiş GO ile hazırlanan doku iskelelerinin gerek gözenek boyutunun gerekse gözeneklilik ve gözeneklerin birbiriyle bağlantı yüzdelerinin kemik doku büyümesine maksimum düzeyde izin verecek değerler olduğu söylenebilir.



**Şekil 4. 4:** Doku iskelelerinin mikro-CT ile ölçülen ortalama gözenek boyutu (sol) ve ortalama gözenek duvar kalınlıkları (sağ).

#### 4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

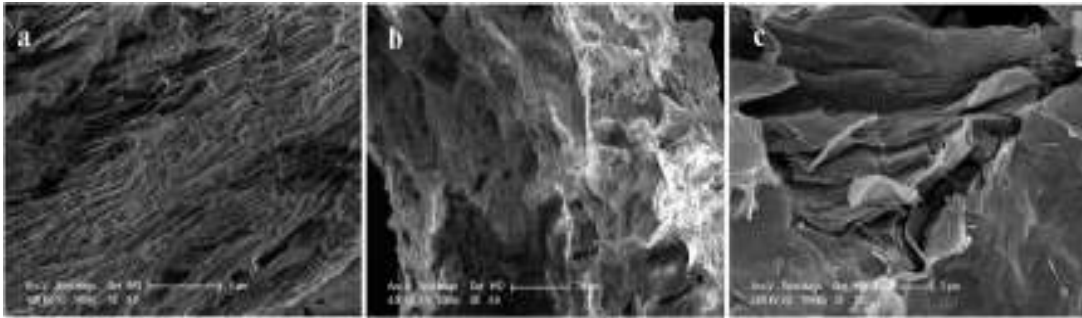
Grafen oksit, yapısında bulunan oksijen içerikli gruplar nedeniyle hidrofilik ve tabakasal bir yapıya sahiptir ve suda kararlı dispersiyonlar oluşturabilme kabiliyeti gösterir. Ancak birçok sentetik polimerin organik çözücülerde çözünebildiği düşünülürse, grafen oksitin bu polimerlerle kompozitlerinin hazırlanmasında bazı modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla son yıllarda grafen oksitin oktadesilamin, siyanat grupları içeren kimyasallar ile modifikasyonu yapılmıştır [239-241]. Ancak bu tür modifikasyonlar için kullanılan kimyasalların toksisitesinin yüksek olması medikal uygulamalar açısından sorun oluşturabilmektedir.

Bu tez çalışmasında, grafen oksitin PLLA/PCL ile kompozitlerinin hazırlanması öncesinde iki farklı fiziksel modifikasyonu (liyofilizasyon ve HFIP ekstraksiyonu) yapılmıştır. Kullanılan yöntemlerin grafen oksitin ve daha sonra hazırlanan doku iskelelerinin yapısına etkisi değişik yöntemler ile incelenmiştir.

Şekil 4-5'de kullanılan grafen oksite ait SEM görüntüleri verilmiştir. Herhangi bir işleme tabi tutulmadan önce grafen oksitin doğal tabakalı yapısını gözlemlemek

mümkündür. Liyofilizasyon işleminden sonra grafen oksitin daha hafif ve süngerimsi bir hal aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4-5b). Liyofilize grafen oksitin bu yapısı SEM analizlerinde de açıkça görülmektedir. Van der Berg ve arkadaşları, bu tip bir işlemi selüloz için uygulamışlar ve bu çalışmada elde edilen liyofilize grafen oksite benzer morfolojik karaktere sahip organik çözücülerde dağılabilen selüloz elde etmişlerdir [242]. Bunun sebebinin liyofilize grafen oksitin düzensiz kümelenmiş yapısı nedeniyle van der Waals kuvvetlerindeki azalma olduğu düşünülmektedir [193, 242].

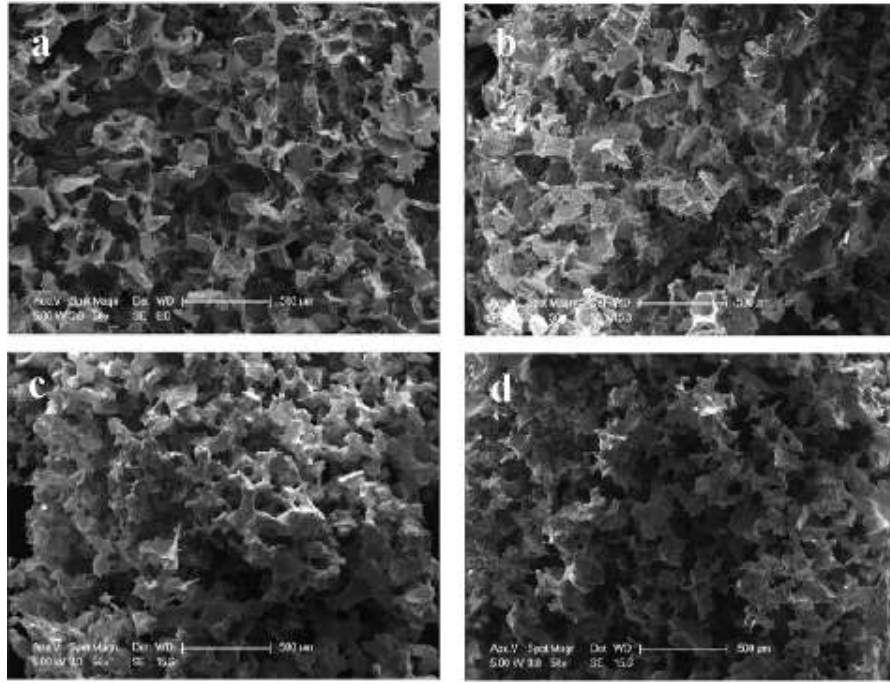
Grafen oksitin PLLA/PCL polimer karışımı içerisinde homojen bir şekilde dağıtılması amacıyla uygulanan bir diğer yöntem, grafen oksitin vakum altında kurutulmamış olan nemli halinin HFIP çözücü fazına geçirilerek polimerler ile karıştırılmasıdır. Bilgimiz dahilinde bu yöntem literatürde tarafımızdan ilk kez denenmiştir. Suyun uzaklaştırılması amacı ile defalarca HPIF içerisinde dağıtılıp santrifüjlenen grafen oksit, işlem sonunda polimer çözelti konsantrasyonuna uygun miktarda HFIP içerisinde dağıtılmıştır. SEM ve XRD analizleri için çözelti oda sıcaklığında kurutularak çözücü uzaklaştırılmıştır. HFIP ekstrakte grafen oksite ait SEM görüntüsü Şekil 4-5c'de verilmiştir. Liyofilize grafen oksit ile karşılaştırıldığında, HFIP ekstrakte grafen oksitin tabakalı yapısını daha iyi koruduğu gözlemlenmiştir. HFIP ekstraksiyonunun grafen oksitin kristal yapısına etkisi Bölüm 4.2.1'de XRD sonuçları ile ayrıntılı olarak açıklanmıştır.



**Şekil 4. 5:** Grafen Oksite ait SEM görüntüleri  
a) Grafen oksit, b) Grafen oksit-FD, c) Grafen oksit-HF.

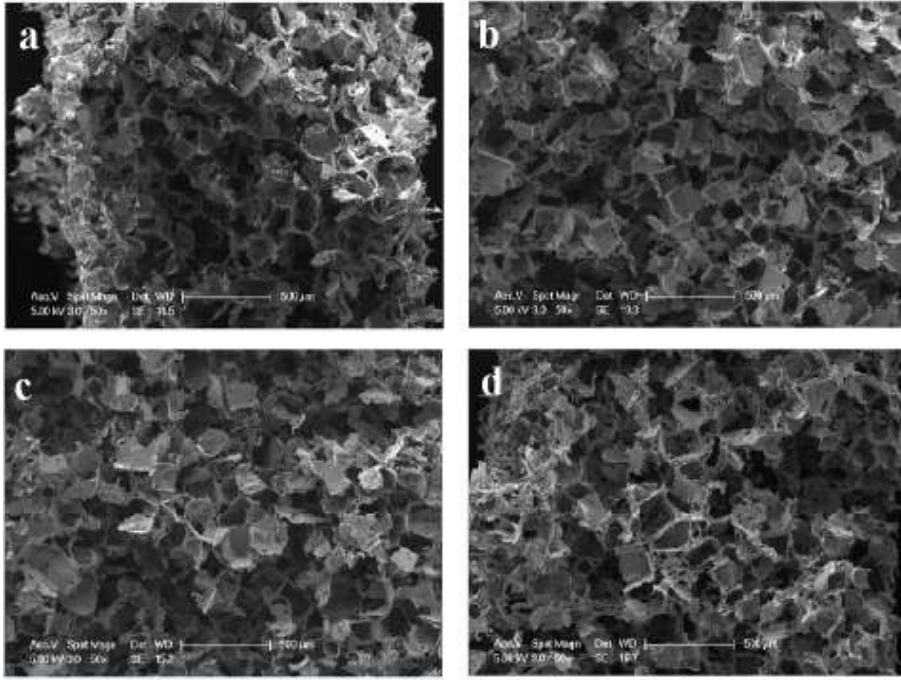
Her iki grafen oksit ile hazırlanan doku iskelelerinin detaylı morfolojik analizi SEM ile yapılmıştır. Şekil 4-6'de değişik oranlarda liyofilize grafen oksit eklenmiş PLLA/PCL doku iskelelerinin görüntüleri verilmiştir. GO-FD'nin süngerimsi yapısı doku iskelelerinin morfolojisini büyük oranda etkilemiştir. GO-FD içeren doku iskeleleri, GO-FD içermeyen doku iskelesine göre daha saçaklı bir gözenek

morfolojisine sahiptir. Bu da yukarıda sözü edilen mikro-CT analizleri sonucu bulunan ortalama gözenek boyutundaki artışı desteklemektedir.



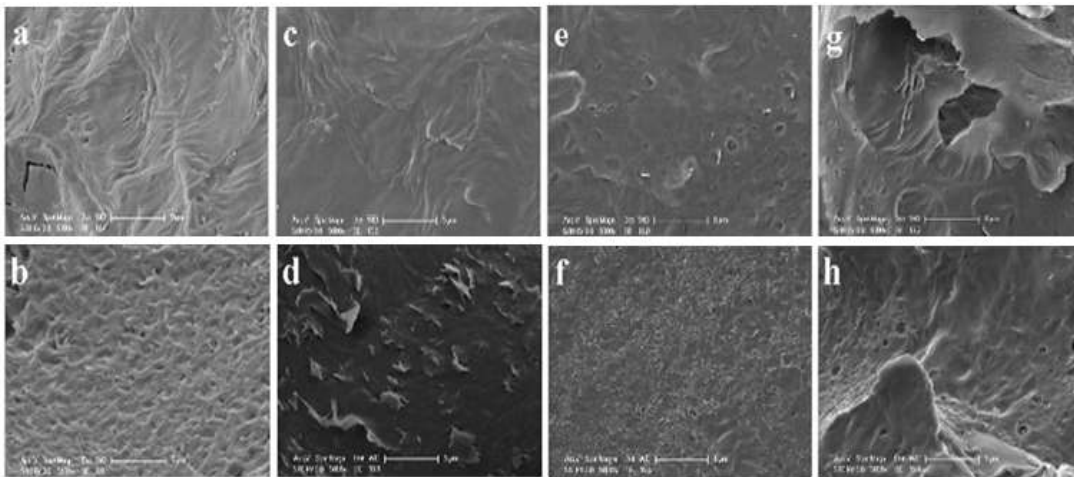
**Şekil 4. 6:** FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelesi SEM görüntüleri  
a) Kontrol-FD, b) %2 GO-FD, c) %5 GO-FD, d) %7 GO-FD.

HFIP ile ekstrakte edilmiş GO kullanıldığı durumda doku iskelelerinin gözenek yapısında kontrol örneğine (GO içermeyen) göre belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 4.7). Ancak gözenek duvarlarında oluşan küçük deliklerin GO miktarı ile artış gösterdiği bulunmuştur. Gözenek duvarlarındaki bu küçük deliklerin, doku iskelesi üzerinde kültüre edilecek olan kemik hücreleri için gerekli olan besin ve oksijen transferine fazladan bir katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.



**Şekil 4. 7:** HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelesi SEM görüntüleri  
a) Kontrol-HF, b) %2 GO-HF, c) %5 GO-HF, d) %7 GO-HF.

Her iki yöntem ile hazırlanan GO'in polimer faz ile homojen dağılımını gözlemlemek amacıyla doku iskelelerinin gözenek duvarları SEM ile yüksek büyütme (x5000) ile görüntülenmiştir (Şekil 4.8). GO-HPIF ile polimer fazın integrasyonunun, GO-FD'ye göre daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Ancak her iki durumda da GO'in agregatlar oluşturmadığı ve GO tabakalarının polimer faz içerisinde bireysel olarak dağılabildiği bulunmuştur.



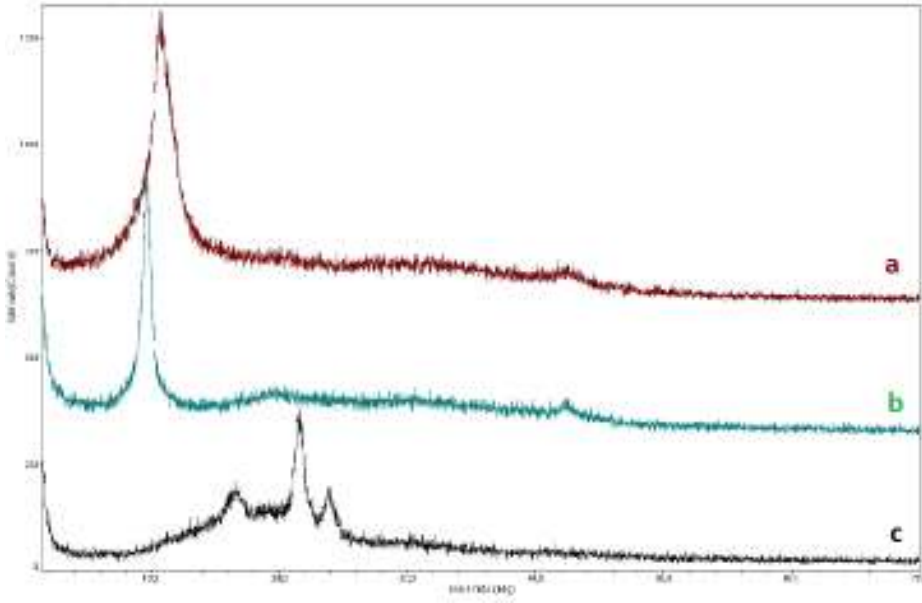
**Şekil 4. 8:** FD ve HF metodları ile hazırlanmış doku iskelesi SEM görüntüleri  
a) Kontrol-HF, b) Kontrol-FD, c) %2 GO-HF, d) %2 GO-FD, e) %5 GO-HF,  
f) %5 GO-FD, g) %7 GO-HF, h) %7 GO-FD.



## 4.2. Fiziksel Yapı ve Kristalinite

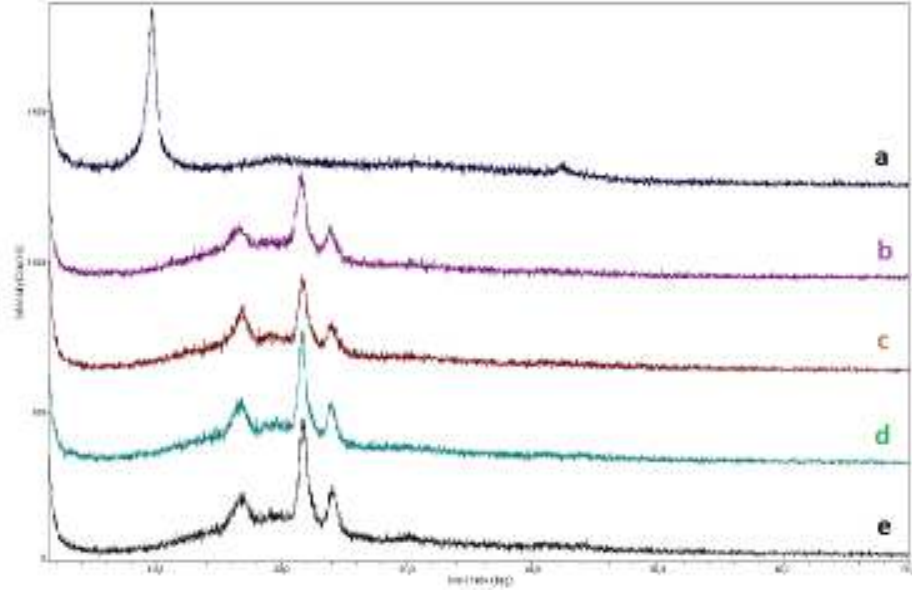
### 4.2.1. X-Işını Difraksiyonu (XRD)

Dolgu malzemesi olarak kullanılan malzemelerin, yarı kristalin polimerlerin kristalizasyon kinetiğini ve kristalin morfolojisini etkilediği bilinmektedir. Polimer/seramik kompozitlerinde, dolgu malzemesi polimerdeki çekirdeklenme (nükleasyon) ve kristal büyümesi üzerinde önemli etkiye sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucunda seramik partiküllerin, polimerin çekirdeklenme prosesi ve kristal büyümesi üzerinde farklı etkiler gösterebildikleri bulunmuştur [243]. Bazı partiküller çekirdeklenmeyi arttıran bir nükleasyon ajanı gibi davranırken, diğer bazı partiküllerin zincirler arasında fiziksel bir bariyer oluşturarak çekirdeklenmeyi engellediği gözlemlenmiştir. Bu bakımdan tek boyutlu karbon nanotüpler ve iki boyutlu kil, birçok polimer için kristalizasyonu arttıran etkili bir nükleasyon ajanı olarak kullanılmaktadır [244, 245]. Bu tez kapsamında kullanılan GO'in polimerlerin kristalinitesi üzerine etkisi XRD analizleri ile incelenmiştir. GO-FD ile hazırlanan doku iskelelerinin istenilen mekanik dayanımı sağlayamaması, kullanıma hazırlanma ve kullanma sırasında bütünlüğünü kaybetme eğilimi nedeniyle sadece GO-HF ve GO-HF ile hazırlanan doku iskelelerinin XRD analizleri yapılmıştır. HFIP ekstraksiyonunun GO'in kristalin morfolojisi üzerine etkisini incelemek amacıyla kurutulmuş GO-HFIP ile vakum altında kurutulmuş GO'in XRD spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.9). Vakum altında kurutulmuş GO için  $10.2^\circ$ 'de difraksiyon piki gözlemlenmiştir. Tabakalar arasındaki mesafe ("d-spacing"),  $8.1 \text{ \AA}$  olarak ölçülmüştür. GO için bulunan bu değerler literatür ile uyuşmaktadır [193, 246]. HFIP ekstraksiyonundan sonra GO'in difraksiyonun pikinin  $9.4^\circ$ 'ye kayarak tabakalar arasındaki mesafenin de  $9.1 \text{ \AA}$ 'e yükseldiği bulunmuştur. Bu durum GO tabakalarının düzenli yapısının bozulduğunun bir göstergesidir. Tabakalar arası etkileşimin azalması GO'in renginin HFIP ekstraksiyonu sonrası siyahtan kahverengiye dönmesinin de sebebidir. GO tabakaları arasındaki zayıf etkileşim, GO tabakalarının daha kolay dağılması bakımından bir avantaj olarak görülebilir.



**Şekil 4. 9:** Grafen oksitin XRD spektrumları;  
a) GO, b) GO-HF, c) Kontrol PLLA/PCL doku iskelesi.

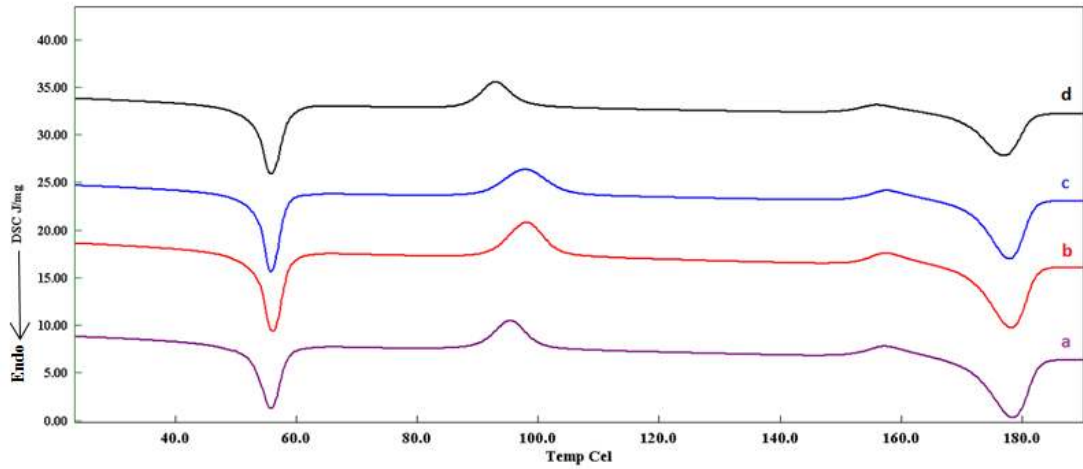
SEM analizleri sonucu makroskopik olarak gözlemlenen GO-HF'nin homojen dağılımı ve polimer faz integrasyonu XRD analizleri ile desteklenmiştir. Şekil 4.10'da, değişik oranlarda GO-HF içeren polimer karışımı ile GO-HF ve polimer karışımının XRD spektrumları verilmiştir. Kontrol olarak belirtilen PLLA/PCL polimerinin XRD spektrumunda  $2\theta=16.7^\circ$ de görülen geniş difraksiyon piki PLLA'nın (110/200) düzlemlerini temsil etmektedir [247, 248].  $2\theta=21.5^\circ$  ve  $23.9^\circ$ de görülen pikler ise sırasıyla PCL'in (110) ve (200) düzlemlerinin yansımalarıdır [249, 250]. GO-HF içeren örneklerde  $9.4^\circ$ deki GO-HF'e ait pikin kaybolması GO-HF'in polimer fazı içerisinde çok iyi dağıldığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, artan GO-HF oranı ile hem PLLA hem de PCL'in difraksiyon piklerinin şiddetlerinde artış gözlenmiştir. Bu durum kompozit içerisindeki her iki polimerin de kristalinitesinin arttığını göstermektedir. Bazı araştırmalar polimerlerdeki artan kristalinitenin hücre yapışmasını azaltabildiğini rapor etmişlerdir [251, 252]. Ancak bu tez kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin yüzey pürüzlülüğü göz önüne alındığında kristalinitenin yarattığı nano düzeydeki topografik değişikliklerin hücre yapışmasına olan etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu düşünülmektedir. Buna karşılık, kristalinitedeki artış, doku iskelesinin mekanik dayanımının artmasına yardımcı olacaktır.



**Şekil 4. 10:** Değişik oranda GO-HF içeren doku iskelelerinin XRD spektrumları;  
a) GO-HF, b) Kontrol, c) %2 GO-HF, d) %5 GO-HF, e) %7 GO-HF.

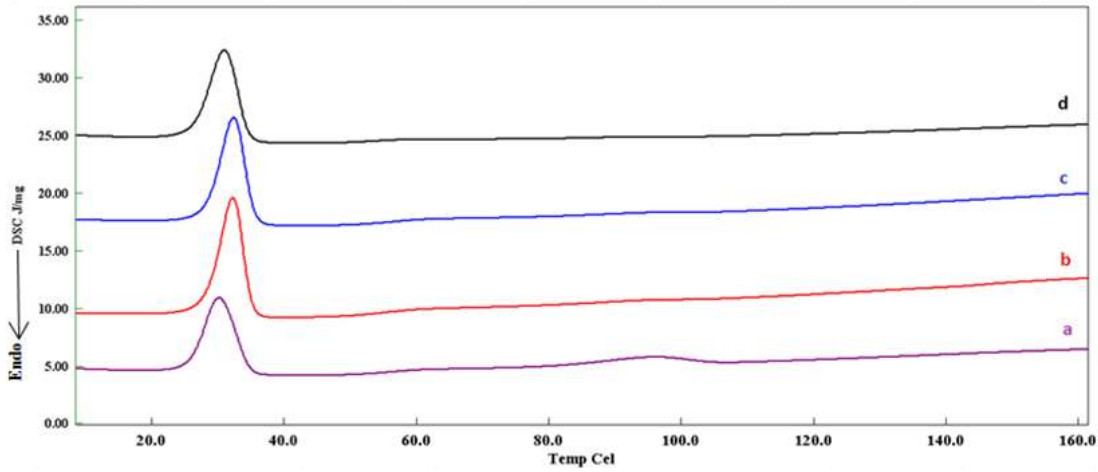
#### 4.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

Üretilen doku iskelelerinin termal özellikleri diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) aracılığı ile incelemiştir. Her iki yöntemle hazırlanan kontrol doku iskelelerine ait termogramlarda PLLA'ya ait endotermik erime piki ( $T_m$ ) ve ekzotermik kristalizasyon piki ( $T_c$ ) sırasıyla  $178^{\circ}\text{C}$  ve  $96^{\circ}\text{C}$  civarında görülmüştür (Şekil 4-11, 12, 13, 14). Aynı şekilde PCL'a ait erime ve kristalizasyon pikleri sırasıyla  $55^{\circ}\text{C}$  ve  $32^{\circ}\text{C}$  civarında görülmüştür. Hem PLLA hem de PCL için elde edilen bu değerler literatür ile uyuşmaktadır [253, 254].



**Şekil 4. 11:** FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerine ait DSC ısıtma grafiği  
a) Kontrol-FD, b) %2 GO-FD, c) %5 GO-FD, d) %7 GO-FD.

Her iki yöntemle hazırlanmış doku iskelelerinde değişen GO miktarlarına karşılık gelen erime sıcaklıkları ve kristalizasyon sıcaklıkları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2' de verilmiştir. Görüleceği üzere doku iskelelerinin içerdiği GO miktarını değişimi ile polimer matrikse ait karakteristik piklerde dikkate değer bir değişim olmamış, bununla birlikte GO miktarı ile pik sıcaklıkları arasında bir korelasyon kurulamamıştır. DSC analizinden alınan verilere dayanarak GO miktarının doku iskelelerine ait termal özellikleri çok etkilemediği söylenebilir.

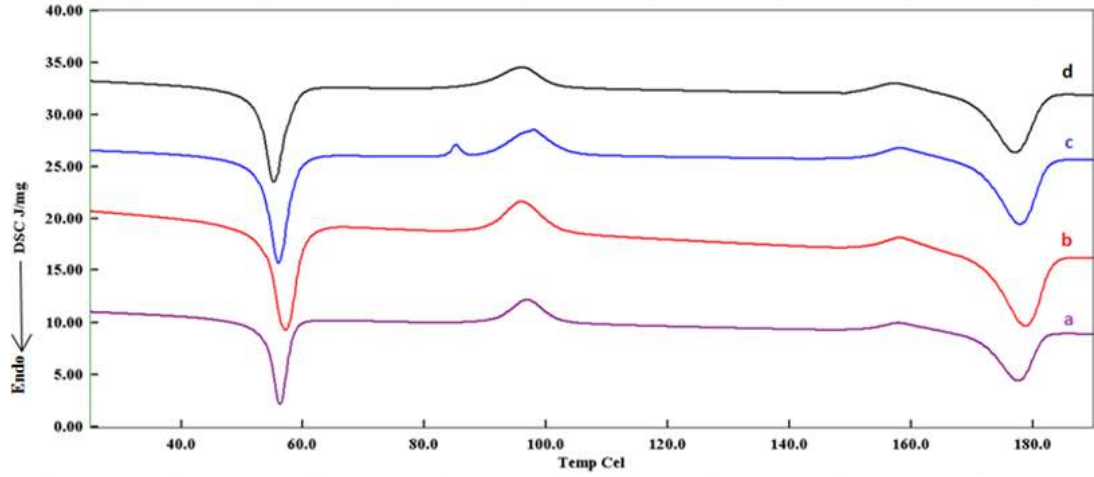


**Şekil 4. 12:** FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerine ait DSC soğutma grafiği  
a) Kontrol-FD, b) %2 GO-FD, c) %5 GO-FD, d) %7 GO-FD

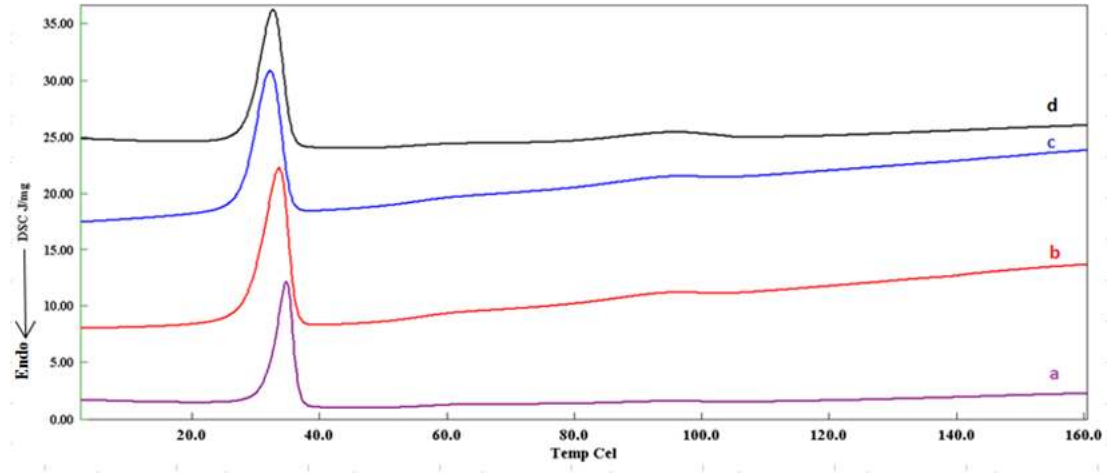
**Çizelge 4. 1:** FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin termal özellikleri.

	Tm(PLLA) (°C)	Tm(PCL) (°C)	Tc(PLLA) (°C)	Tc(PCL) (°C)
Kontrol-FD	178,3	55,9	95,4	30,1
%2 GO-FD	178,2	56	98,1	32,3
%5 GO-FD	178	55,8	97,8	32,4
%7 GO-FD	176,9	55,7	92,9	31,1

**Not:** PLLA ' e ait camsı geçiş sıcaklığı (Tg) ile PCL 'a ait ergime sıcaklıkları çakıştığı için DSC termogramlarında PLLA 'in Tg değerleri görülememiştir.



Şekil 4. 13: HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerine ait DSC ısıtma grafiği  
a) Kontrol-HF, b) %2 GO-HF, c) %5 GO-HF, d) %7 GO-HF.



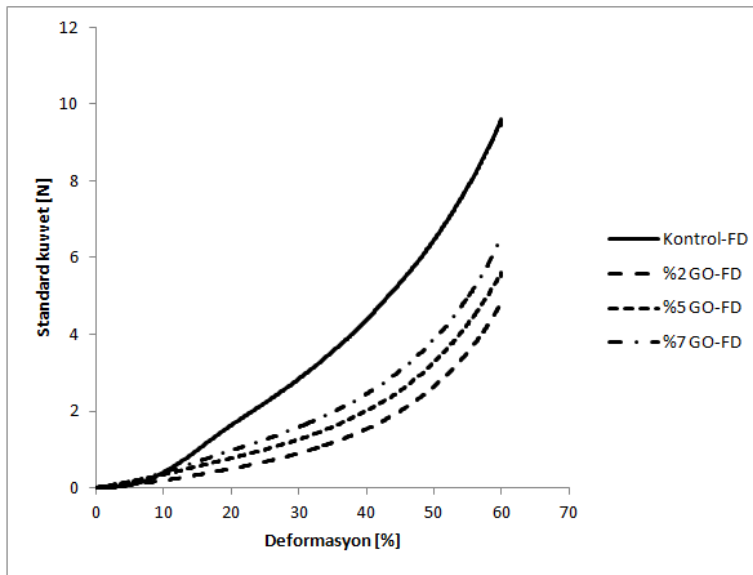
Şekil 4. 14: HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerine ait DSC soğutma grafiği  
a) Kontrol-HF, b) %2 GO-HF, c) %5 GO-HF, d) %7 GO-HF.

Çizelge 4. 2: HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin termal özellikleri.

	Tm(PLLA) (°C)	Tm(PCL) (°C)	Tc(PLLA) (°C)	Tc(PCL) (°C)
Kontrol-HF	177.7	56.2	96.8	34.8
%2 GO-HF	178.9	57.2	96.1	33.6
%5 GO-HF	178	56	98	32.3
%7 GO-HF	177.1	55.3	96.2	32.6

### 4.2.3. Basma Testi

Doku mühendisliğinde kullanılan üç boyutlu yapılardan istenilen bir diğer önemli gereksinim, rejenere edilecek doku ile mekanik özelliklerinin uyuşması ve yeni doku fonksiyonunu gerçekleştirmeye başlayana kadar mekanik olarak destek sağlamasıdır. İki farklı yöntemle hazırlanan doku iskelelerinin basma kuvveti-deformasyon grafikleri Şekil 4.15 ve 4.16'de verilmiştir. Bu grafiklerden bütün örneklerin düşük basma kuvvetinde (tipik olarak %10'dan küçük) lineer bir elastiklik gösterdiği ve daha sonra hafif bir düzlük (plato) yaparak en sonunda ise malzemenin sıkışmasına bağlı olarak basma kuvvetinde hızlı bir artış gösterdiği görülmektedir. Buradaki plato bölgesinin tam olarak düz olmadığı ve deformasyon ile kuvvetin arttığı gözlenmiştir. Bu tip davranış genellikle polietilen gibi malzemelerin kapalı-hücre köpüklerinde görülmektedir. Bunun sebebinin gözenek hücreleri içerisindeki gazın hücre duvarlarında oluşan membran stresi ile birlikte sıkışması olarak açıklanmıştır [255]. Ancak bu etki bu tez kapsamında üretilen doku iskelelerinde gözenekler arası bağlantısının çok yüksek olması ve bu durumun yapıdan gaz akışına izin vermesi ile önlenebilecektir.

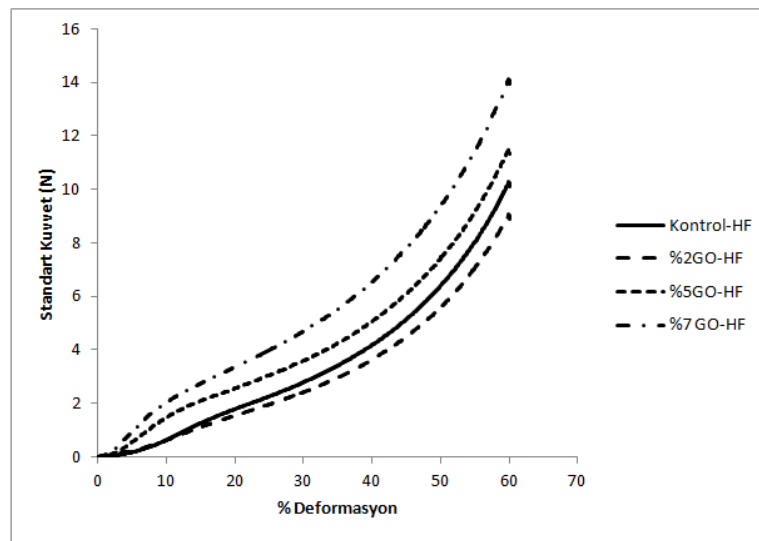


Şekil 4. 15: FD yöntemiyle hazırlanmış doku iskelesi basma testi grafiği.

**Çizelge 4. 3:** FD yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin basma test değerleri.

	E-Modül (MPa)	Fmax (N)	$\sigma$ (N/mm <sup>2</sup> )
Kontrol-FD	0,26	10	0,2
%2 GO-FD	0,0472	4,91	0,1
%5 GO-FD	0,0714	5,53	0,11
%7 GO-FD	0,117	6,81	0,14

Elde edilen doku iskelelerinin mekanik özellikleri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde GO-FD ile hazırlanan örneklerin mekanik dayanımının GO-HF ile hazırlanan örneklere göre oldukça düşük olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3 ve 4.4). Bu durumun GO-FD'nin hafif ve süngerimsi bir fiziksel yapıda olması ve bunun doku iskelelerinin morfolojisini de büyük ölçüde etkilemesinden kaynakladığı düşünülmektedir. GO-HF ile hazırlanan üç boyutlu yapılarda ise GO-HF ilavesinin örneklerin elastiklik modülünü arttırdığı ve bu artışın %7 GO-HF içeren örneklerde %79'a kadar çıktığı gözlemlenmiştir. Bu da tezin amaçlarından biri olan doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi hedefine ulaşıldığını göstermektedir. Mekanik özelliklerdeki artışın kaynağının GO'in takviye edici özelliğinin yanısıra polimer faza ait kristalinitedeki değişikliklerin olduğu düşünülmektedir. Ancak bu etkilerin hangisinin sonucu ne oranda değiştirdiğini belirlemek mümkün değildir.



**Şekil 4. 16:** HF yöntemiyle hazırlanmış doku iskelesi basma testi grafiği.

**Çizelge 4. 4:** HF yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin basma test değerleri.

	E-Modül (Mpa)	Fmax (N)	$\sigma$ (N/mm <sup>2</sup> )
Kontrol-HF	0.264	10,8	0,22
%2 GO-HF	0,244	9,8	0,19
%5 GO-HF	0,37	11,5	0,23
%7 GO-HF	0.473	13,7	0,27



## 5. SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında, grafen oksitle takviye edilmiş polimer nano kompozitler kullanılarak kemik doku tedavilerinde kullanımı amaçlanan gözenekli doku iskeleleri hazırlandı ve kompozit içerisindeki grafen oksit miktarının doku iskelesinin özelliklerini ne şekilde değiştirdiği incelendi. Grafen oksit kullanımıyla doku iskelesine ait mekanik özelliklerin ve osteoindüktif özelliklerin geliştirilmesi amaçlandı. Doku iskelelerinin hazırlanması sürecinde grafen oksitin polimer faz içerisinde homojen olarak dağılımını sağlamak için iki farklı yöntem ve iki farklı çözücü kullanıldı. İlk yöntemde, öncelikle GO liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu ve kloroform içerisinde dispers edildikten sonra polimer çözeltileri hazırlandı. İkinci yöntemde ise nemli GO'in HFIP içerisinde ekstraksiyonu yapıp, dispersiyonu tamamlandıktan sonra polimer çözeltisi hazırlandı. Gözenekli doku iskeleleri partikül uzaklaştırma yöntemi ve gözenekler arası bağlantılar süperkritik karbondioksit yöntemiyle elde edildi. Elde edilen doku iskelelerinin özellikleri değişik metodlarla karakterize edildi. Karakterizasyon sonucu elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Micro-CT analizleri, her iki yöntemle hazırlanan doku iskelelerinin gözenek boyutu, porozite ve gözenekler arası bağlantı yüzdelерinin kemik doku büyümesine maksimum düzeyde izin verecek değerlere sahip olduğunu göstermiştir.
- SEM görüntüleri, liyofilizasyon işleminden sonra GO'in daha hafif ve süngerimsi bir hal aldığını göstermiştir ki tabakalı yapısı bozulan GO'in organik çözücüler ve polimer faz içerisinde daha iyi dağılacığı aşıkardır. Bu durumun GO tabakaları arasındaki van der Waals kuvvetlerinin zayıflamasından kaynaklandığı düşünülmüştür. HFIP ile ekstrakte edilen GO'in tabakalı yapısını daha iyi koruduğu gözlenmiştir. Doku iskelelerine ait SEM görüntülerinde GO-FD doku iskelelerinin kontrol örneğine göre daha saçaklı bir yapı aldığı, GO-HF doku iskelelerinde ise gözenekler arası bağlantıların artan GO miktarı ile çoğaldığı gözlenmiştir. Yüksek büyütme oranlarında, GO-HPIF ile polimer fazın integrasyonun, GO-FD'ye

göre daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Ancak her iki durumda da GO'in agregatlar oluşturmadığı ve GO tabakalarının polimer faz içerisinde bireysel olarak dağılabildiği bulunmuştur.

- Yapılan XRD analizlerinde HFIP ile ekstrakte edilen GO'e ait tabakalar arası mesafesinin arttığı görülmüş ve tabakalı yapısının bozulduğu anlaşılmıştır. GO-HF yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerine ait piklerde GO'e ait karakteristik pikin kaybolması, GO tabakalarının polimer faz içerisinde aglomere olmayıp homojen bir şekilde dağıldığını kanıtlamaktadır. Bununla birlikte polimerlere ait difraksiyon piklerinin şiddetlerinin artması GO'in polimer fazın kristalliğini arttırdığını göstermektedir.
- Hazırlanan doku iskelelerinin DSC yöntemi ile yapılan termal analizlerinde, polimer fazın karakteristik piklerinde kayda değer bir değişiklik gözlemlenmemiştir.
- Doku iskelelerinin mekanik özellikleri basma testleri ile karakterize edilmiştir. GO-FD yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerinin mekanik dayanımlarının, GO-HF yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerine ait değerlerin altında kaldığı gözlenmiş olup, GO-HF yöntemi ile hazırlanan doku iskeleleri kendi içinde karşılaştırıldığında, artan GO miktarı ile elastiklik modülü değerinde %79'a kadar bir artış gözlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] **Stock, U. A., and Vacanti, J. P.**, 2011: Current state and prospects. Annual Review of Medicine Vol. 52 , pp. 443-451.
- [2] **Giannoudis, PV., Dinopoulos, H., and Tsiridis, E.**, 2005 Bone substitutes: an update. Injury 36 Suppl 3, S20\_7.
- [3] **Saito, E.**, 2011: Designed Biodegradable and Osteoconductive Porous Scaffolds for Human Trabecular Bone, *PhD Thesis*, The University of Michigan, MI
- [4] **Marie, P.**, 1997: Growth factors and bone formation in osteoporosis: roles for IGF-I and TGF-beta. Revue du rhumatisme (English ed.), 64(1), pp. 44-53.
- [5] **Shea, L. D., Wang, D., Franceschi, R. T., Mooney, D. J.**, 2000: Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds. Tissue engineering, 6(6), pp. 605-617
- [6] **Yang, X., Tare, R. S., Partridge, K. A., Roach, H. I., Clarke, N. M. P., Howdle, S. M., Oreffo, R. O.**, 2003: Induction of Human Osteoprogenitor Chemotaxis, Proliferation, Differentiation, and Bone Formation by Osteoblast Stimulating Factor-1/Pleiotrophin: Osteoconductive Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering. Journal of Bone and Mineral Research, 18(1), 47-57. (doi: 10.1359/jbmr.2003.18.1.47)
- [7] **Kenley, R. A., Yim, K., Abrams, J., Ron, E., Turek, T., Marden, L. J., Hollinger, J. O.**, 1993: Biotechnology and Bone Graft Substitutes. Pharmaceutical Research, 10(10), 1393-1401. (doi: 10.1023/a:1018902720816)
- [8] **Ma, P. X. & Langer, R.**, 1998: Fabrication of biodegradable polymer foams for cell transplantation and tissue engineering. In Tissue Engineering Methods and Protocols, Vol. 18, pp. 47-56
- [9] **Laurencin, C. T.; Ambrosio, A. M. A.; Borden, M. D., Cooper, J. A.**, 1999: Tissue engineering: orthopedic applications, Annu. Rev. Biomed. Eng. Vol. 1, 19-46.
- [10] **Chung, C., Kim, Y. -K., Shin, D., Ryoo, S. -R., Hong, B. H., Min, D. - H.**, 2013: Biomedical application of graphene and graphene oxide, Acc. Chem. Res., 46, pp. 2211-2224.
- [11] **Lu, B., Li, T., Zhao, H., Li, X., Gao, C., Zhang, S., Xie, E.**, 2012: Graphene-based composite materials beneficial to wound healing, Nanoscale , Vol. 4, pp. 2978-2982.
- [12] **Lee, S. K., Kim, H., Shim, B. S.**, 2013: Graphene: an emerging material for biological tissue engineering, Carbon Lett., Vol. 14, pp. 63-75.
- [13] **Kim ,K. S., Zhao , Y., Jang ,H., Lee , S. Y., Kim, J. M., Kim, K. S., Ahn, J. H., Kim, P., Choi, J.- Y., Hong, B. H.**, 2009: Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes, Nature Vol. 457, pp. 706-710.

- [14] **Stolyarova, E., Rim, K. T., Ryu, S., Maultzsch, J., Kim, P., Brus, L. E., Heinz, T. F., Hybertsen, M. S., Flynn, G. W.,** 2007: High-resolution scanning tunneling microscopy imaging of mesoscopic graphene sheets on an insulating surface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104,9209.
- [15] **Dreyer, D. R., Park, S. J., Bielawski, C. W., Ruoff, R. S.,** 2010: The chemistry of graphene oxide,” *Chem. Soc. Rev.*, 39, 228.
- [16] **Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J. W., Potts, J. R., Ruoff, R.S.,** 2010: Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications, *Adv. Mater.*, 22, 3906.
- [17] **Sun, X., Liu, Z., Welsher, K., Robinson, J. T., Goodwin, A., Zaric, S., Dai, H.,** 2008: Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery, *Nano Res.*, Vol. 1(3), pp. 203-212.
- [18] **Wang, C., Li, Y., Ding, G., Xie, X., Jiang, M.,** 2013: Preparation and characterization of graphene oxide/poly(vinyl alcohol) composite nanofibers via electrospinning, *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 127, pp. 3026-3032.
- [19] **Rodan, G.A.,** 1992: Introduction to Bone Biology. *Bone*, 13:S3-S6
- [20] **Harada, S and Rodan, GA.,** 2003: Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, Vol. 423, pp. 349-55.
- [21] **Cullinane, D. M. Einhorn, T. A.,** 2002: Biomechanics of bone, in principles of bone biology, second edition (eds: Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., rodan, G.), academic press., San Diego, California, USA
- [22] **Michael A.K.,** 2004: Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone, *Biomaterials*. Vol. 25, pp. 1697-1714.
- [24] Interactive Bone Anatomy, <http://www.aokainc.com/interactive-bone-anatomy/>
- [25] **Meier, D. E., Orwoll, E. S., & Jones, J. M.,** 1984: Marked disparity between trabecular and cortical bone loss with age in healthy men. Measurement by vertebral computed tomography and radial photon absorptiometry. *Annals of internal medicine*, Vol. 5, pp. 605-612.
- [26] **Hill, P. A.,** 1998: Bone remodelling. *British journal of orthodontics*, Vol. 25(2), pp. 101-107.
- [27] **Osaka, A., Miura, Y., Takeuchi, K., Asada, M., Takahashi, K.,** 1991: Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 2(1), pp. 51-55. (doi: 10.1007/bf00701687)
- [28] **Viguet-Carrin, S., Garnero, P., Delmas, P.D.,** 2006: The role of collagen in bone strength, Vol. 17, pp. 319–336
- [29] **Kalfas, I.H.,** 2001: Principles of bone healing, *Neurosurg Focus*, Vol. 10(4), Article 1.
- [30] **Prolo DJ,** 1990: Biology of bone fusion. *Clin Neurosurg*, Vol. 36, pp. 135–146.
- [31] **Recker RR,** 1992: Embryology, anatomy, and microstructure of bone, in Coe FL, Favus MJ (eds): *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. New York: Raven, pp. 219–240.
- [32] **Niyibizi, C., Eyre D.R.,** 1994: Structural characteristics of crosslinking sites in type V collagen of bone chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur J Biochem*. Vol. 224, pp. 943–950.
- [33] **Niyibizi, C., Eyre D.R.,** 1989: Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connect Tissue Res*, Vol. 20, pp. 247–250.

- [34] **Palmer, L.C., Newcomb, C.J., Kaltz, S.R., Spoerke, E.D., Stupp, S.I.**, 2008: Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem Rev*, Vol. 108, pp. 4754.
- [35] **Downey, P.A., Siegel, M.I.**, 2006: Osteoporosis Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis, *Phys. Ther.*, Vol. 86, pp. 77-91.
- [36] **Farbod, K., Nejadnik, M.R., Jansen, J.A., Leeuwenburgh, S C.G.**, 2014: Interactions Between Inorganic and Organic Phases in Bone Tissue as a Source of Inspiration for Design of Novel Nanocomposites, *Tissue Engineering*, Vol. 20, pp. 173.
- [37] **Morgan, E.F., Barnes, G.L., and Einhorn, T.A.**, 2008: The bone organ system: form and function. In: Marcus, R., Feldman, D., Nelson, D., and Rosen, C.J., eds. *Fundamentals of Osteoporosis*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, pp. 1–25.
- [38] **Beniash, E. Biominerals, 2011:** Hierarchical nanocomposites: the example of bone. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, Vol.3, pp. 47.
- [39] Bone structure and function, <http://open.jorum.ac.uk/xmlui/handle/10949/2475>, Alındığı tarih: 15.06.2014.
- [40] **Ross, M.H., Pawlina, W.**, 2006: *Hystology*, pp. 209, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- [41] **Boyce, B. F., Yao, Z., Zhang, Q., Guo, R., Lu, Y. A. N., Schwarz, E. M., Xing, L.**, 2007: New Roles for Osteoclasts in Bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1116(1), pp. 245-254.
- [42] **Lorenzo, J. A.**, 2011: Do osteoclasts have dual roles: Bone resorption and antigen presentation?. *IBMS BoneKEy*, Vol. 8(1), pp. 37-40. (10.1138/20110488) .
- [43] **Blair, H. C., Kahn, A. J., Crouch, E. C., Jeffrey, J. J., Teitelbaum, S. L.**, 1986: Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 102(4), pp. 1164-1172.( doi: 10.1083/jcb.102.4.1164) .
- [44] **Murphy, G., Reynolds, J.J.**, 2003: *Extracellular Matrix Degradation. Connective Tissue and Its Heritable Disorders* pp. 343-384. New York, New York: John Wiley & Sons
- [45] **Neutzsky-Wulff, A., Sorensen, M., Kocijancic, D., Leeming, D., Dziegiel, M., Karsdal, M., Henriksen, K.**, 2010: Alterations in osteoclast function and phenotype induced by different inhibitors of bone resorption - implications for osteoclast quality. *BMC Musculoskeletal Disorders*, Vol. 11(1), pp. 109.
- [46] **Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Becker R.** 1996: Bone biology, part I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr. Course Lect.* Vol. 45, pp. 371–386.
- [47] **Açıklın, E, Bayçu, C., Gürer, F., Aral, E.**, 1995: *Histoloji*, pp. 129. Anadolu University.
- [48] **Khan, Y.M.**, 2005: *Development of a Polymer/Ceramic Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering*, PhD. Thesis, Drexel University
- [49] **Sikavitsas, V. I., Temenoff, J. S., Mikos, A. G.**, 2001:*Biomaterials*, Vol. 22, pp. 2581.
- [50] **Hill, P.A.**,1998: Bone remodelling, *Br J Orthod* Vol. 25, pp. 101.

- [51] **Baron, R.**, 1993: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism'', 2nd edition, Raven Press, New York, pp. 3.
- [52] **Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R.** 1996: Bone biology, part II: formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. JBJSInstr Course Lect., Vol. 45, pp. 387–399.
- [53] **Ostrum R.** 2000: Bone Injury, Regeneration, and Repair. In Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System. Buckwalter JA, Eihnhorn TA, Simon SR.
- [54] **McKibbon B.**, 1978: The Biology of Fracture Healing in Long Bones. J Bone Joint Surg. Br., Vol. 60(2), pp. 150-162.
- [55] **Carano, RAD, Filvaroff, EH.** 2003:Angiogenesis and Bone Repair. Drug Discovery Today. Vol. 8(21), pp. 980-989.
- [56] **Caputo E.**, 1999: Healing of Bone and Connective Tissues. In: Orthopaedics: Principles of Basic and Clinical Science CRC Press Boca Raton ed. Bronner F. and Worrell RV.
- [57] **Langer, R., Vacanti, J. P.**, 1993: Tissue engineering Science, Vol. 260, pp.920.
- [58] **Laurencin, C. T., Ambrosio, A. M. A., Borden, M. D., Cooper, J. A.**, 1999: Tissue engineering: orthopedic applications, Annu. Rev. Biomed. Eng., Vol. 1, pp. 19-46.
- [59] **Hench, L.L.,1998:** Bioceramics, Journal of the American Ceramic Society, Vol. 81, pp. 1705-1728.
- [60] **Lam, C.X.F.**, 2003: MSc. Thesis, Development and degradation studies of bioactive polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering, National University of Singapore.
- [61] **Leor, J., Amsalem, Y., Cohen S.**, 2005: Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering, Pharmacology & Therapeutics, Vol. 105, pp. 151– 163.
- [62] Doku mühendisliği prosesi, <http://www.quinxell.com/> Alındığı tarih: 15.06.2014.
- [63] **Chapekar, M.S.**, 2000: Tissue engineering: Challenges and opportunities, Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 53, pp. 617-620.
- [64] **Langer, R., Tirrell, D.A.**, 2004: Designing materials for biology and medicine. Nature, Vol. 428, pp. 487–492.
- [65] **Burg, K. J., Porter, S., Kellam, J. F.**, 2000: Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials, Vol. 21, pp. 2347-2359.
- [66] **Chan, B. P., Leong, K.W.**, 2008: Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. Eur Spine J, Vol. 17, pp. 467-479.
- [67] **Howard, D., Buttery, L. D., Shakesheff, K. M., Roberts, S. J.**, 2008: Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds. J Anat, Vol. 213, pp. 66-72.
- [68] **Chapekar, M.S.**, 2000: Tissue engineering: Challenges and opportunities. J. Biomed. Mater. Res., Vol. 53, p.617–620.
- [69] **Ma, P. X.**, 2004: Tissue engineering. In: Encyclopedia of Polymer Science and Technology, edited by J. I. Kroschwitz. Hoboken, NJ: Wiley, in press.
- [70] **Liu, X., MA, P.X.**, 2003: Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering, Annals of Biomedical Engineering, Vol. 32, pp. 477-486.

- [71] **Ma, P. X., Langer, R.**, 1995: Degradation, structure and properties of fibrous nonwoven poly(glycolic acid) scaffolds for tissue engineering. In: *Polymers in Medicine and Pharmacy*, edited by A. G. Mikos, K. W. Leong, M. L. Radomsky, J. A. Tamada, and M. J. Yaszemski. Pittsburgh, PA: MRS, , pp. 99–104.
- [72] **Maquet, V., Jerome, R.**, 1997: Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. *Mater. Sci. Forum* 250, pp. 15–42.
- [73] **Burg, K. J. L., Porter, S., Kellam, J. F.**, 2000: Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 2347–2359.
- [74] **Bauer, TW., Muschler, GF.**, 2000: Bone graft materials. An overview of the basic science, *Clin Orthop Relat Res.*, Vol. 371, pp. 10-27.
- [75] **Torres, J., Tamimi, F., Alkhraisat, M., Prados-Frutos, J.C., Lopez-Cabarcos, E.**, 2011: Implant Dentistry - The Most Promising Discipline of Dentistry, pp. 91-105, DOI: 10.5772/19706.
- [76] **Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E.**, 1996: *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, California, Academic Pres. pp. 1198.
- [77] **Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E.**, 2005: Bone substitutes: an update. *Injury*, Vol. 36 Suppl 3:20-7.
- [78] **Hing KA.**, 2004: Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, Vol. 362, 2821-2850.
- [79] **Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA.**, 2008: Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*, Vol. 5, pp. 1137-1158.
- [80] **Niinomi M.**, 2008: Metallic biomaterials. *J Artif Organs*, Vol. 11, pp. 105-110.
- [81] **Chau AM, Mobbs RJ.**, 2009: Bone graft substitutes in anterior cervical discectomy and fusion. *Eur Spine J.*, Vol. 18, pp. 449-464.
- [82] **Goldberg, V. M., Caplan, A. I., 2004:** Principles of tissue engineering and regeneration of skeletal tissue, in *orthopedic tissue engineering*, pp. 1-10 marcel dekker, inc., New York.
- [83] **Cho, Y., Gosain, A.**, 2004: Biomaterials in craniofacial reconstruction. *Clin. Plastic Surg.*, Vol. 31, pp. 377-385.
- [84] **Elshahat, A., Shermak, M., Inoue, N., Chao, E., Manson, P.**, 2004: The use of novabone and norian in cranioplasty: A comparative study. *J. Craniof. Surg.*, Vol. 15, pp. 483-489.
- [85] **Eppley, B.**, 2005: Invited discussion: A comparison of resistance to fracture among four commercially available forms of hydroxyapatite cement. *Annals Plastic Surg.*, Vol. 55, pp. 93-100.
- [86] **Greenberg, B., Scheneider, S.**, 2005: Alloplastic reconstruction of large cranio-orbital defects: A comparative evaluation. *Annals Plastic Surg.*, Vol. 55, pp. 43-51.
- [87] **Moreira-Gonzalez, A., Jackson, I., Miyawaki, T., Barakat, K., Dinick, V.**, 2003: Clinical outcome in cranioplasty: Critical review in long-term follow-up. *J. Craniof. Surg.*, Vol. 14, pp. 144-153.
- [88] **Mishra, S., Knothe-Tate, M.L.**, 2003: Effect of lacunocanicular architecture on hydraulic conductance in bone tissue: Implications for bone health and evolution. *Anat. Rec.*, Vol. 273A, pp. 752-762.
- [89] **Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J.**, 2001: Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Prog. Mater. Sci.*, Vol. 46, pp. 273-282.

- [90] **Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D., Schwartz, Z.**, 1996: Role of materials surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, Vol. 17, pp. 137-146.
- [91] **Sumner, D.R., Turner, T.M., Igloria, R., Urban, R.M., Galante, J.O.**, 1998: Functional adaptation and ingrowth of bone vary as a function of hip implant stiffness. *J. Biomech.*, Vol. 31, pp. 909-917.
- [92] **Brunette, D.M., Ratkay, J., Chehroudi, B.**, 1991: The behavior of osteoblasts on micromachined surfaces. In *Bone–Biomaterial Interface*; pp. 170-180 Davies, J.E., Ed.; University of Toronto Press: Toronto, Canada.
- [93] **Boyan, B.D., Hummert, T.W., Kieswetter, K., Schraub, D., Dean, D.D., Schwartz, Z.**, 1995: Effect of titanium surface characteristics on chondrocytes and osteoblasts in vitro. *Cells Mater.*, Vol. 5, pp. 323-335.
- [94] **Sun, W.; Starly, B., Nam, J., Darling, A.**, 2005: Bio-CAD modeling and its applications in computeraided tissue engineering. *Comput. Aided Des.*, Vol. 37, pp. 1097-1114.
- [95] **Lee, C. H., Singla, A., Lee, Y.**, 2001: Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*, Vol. 221, pp. 1-22.
- [96] **Bensaid, W., Triffitt, J. T., Blanchat, C. A.**, 2003: biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2497-502.
- [97] **Pitaru, S., Tal, H., Soldinger, M., Grosskopf, A. & Noff, M.**, 1988: Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. *Periodontol*, Vol. 59, pp. 380-386.
- [98] **Negri, S., Fila, C., Farinato, S., Bellomi, A. & Pagliaro, P. P.**, 2007: Tissue engineering: chondrocyte culture on type 1 collagen support. Cytohistological and immunohistochemical study. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* Vol. 1, pp. 158-159.
- [99] **Flanagan, T. C. et al.** 2006:A collagen-glycosaminoglycan co-culture model for heart valve tissue engineering applications. *Biomaterials* Vol. 27, pp. 2233-2246.
- [100] **Di Martino, A., Sittinger, M. & Risbud, M. V.**, 2005: Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 5983-5990.
- [101] **Chun, H. J., Kim, G. W. & Kim, C. H.**, 2008: Fabrication of porous chitosan scaffold in order to improve biocompatibility. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. Vol. 69, pp. 1573-1576.
- [102] **Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvão, M. R. & Rocha, J.**, 2001: Determination of the degree of acetylation of chitin materials by <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectroscopy. *Biological Macromolecules*, Vol. 28, pp. 359-363.
- [103] **Zhou, H. Y. et al.**, 2008: Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. *Carbohydrate Polymers* Vol. 73, pp. 265-273.
- [104] **Hsu, S. H. et al.**, 2004: Chitosan as Scaffold Materials: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Journal of Polymer Research*, Vol. 11, pp. 141-147.



- [105] **Zhong, S. P. et al.**, 2007: Development of a novel collagen-GAG nanofibrous scaffold via electrospinning. *Materials Science and Engineering: C Symposium A: Advanced Biomaterials International Conference on Materials for Advanced Technologies*, Vol. 27, pp. 262-266.
- [106] **Birk, D. E., Lande, M. A. & Fernandez-Madrid, F. R.**, 1981: Collagen and glycosaminoglycan synthesis in aging human keratocyte cultures. *Experimental Eye Research*, Vol. 32, pp. 331-339.
- [107] **Weiss, C., Balazs, E. A., St.Onge, R. & Denlinger, J. L.**, 1981: Clinical studies of the intraarticular injection of HealonR (sodium hyaluronate) in the treatment of osteoarthritis of human knees. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* Vol. 11, pp. 143-144.
- [108] **Holzman, S. & Connolly, R. J.**, 1994: Effect of Hyaluronic Acid Solution on Healing of Bowel Anastomoses. *Journal of Investigative Surgery*, Vol. 7, pp. 431 - 437.
- [109] **Grigolo, B. et al.**, 2001: Evidence for re-differentiation of human chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative scaffold. *Arthritis Res* Vol. 3, pp. 7.
- [110] **Giordano, C., Sanginario, V., Ambrosio, L., Silvio, L. D. & Santin, M.**, 2006: Chemical-Physical Characterization and in vitro Preliminary Biological Assessment of Hyaluronic Acid Benzyl Ester-Hydroxyapatite Composite. *J Biomater Appl.*, Vol. 20, pp. 237-252.
- [111] **Motta, A., Migliaresi, C., Lloyd, A. W., Denyer, S. P. & Santin, M.**, 2002: Serum protein adsorption on silk fibroin fibres and membranes: surface opsonization and binding strength. *Journal of bioactive and compatible polymers* Vol. 17, pp. 23-35.
- [112] **Motta, A., Fambri, L. & Migliaresi, C.**, 2002: Regenerated silk fibroin films: Thermal and dynamic mechanical analysis. *Macromolecular Chemistry Physics* Vol. 203, pp. 1658-1665.
- [113] **Rahfoth, B. et al.**, 1998: Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 6, pp. 50-65.
- [114] **Carletti, E.**, 2009: 3D scaffolds for tissue engineering produced by microfabrication technology, Phd. Thesis, Department of Materials Engineering and Industrial Technologies, University of Trento, Italy. pp. 24-25.
- [115] **Gunatillake, P. A. & Adhikari, R.**, 2003: Biodegradable synthetic polymer for tissue engineering. *European Cells and Materials*, Vol. 5, pp. 1-16.
- [116] **Vacanti, J. P. & Langer, R.**, 1997: *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds* (ed. Anthony Atala, D. J. M.).
- [117] **Langer, R. & Vacanti, J. P.**, 1993: *Tissue Engineering, Science*, Vol. 260, pp.920.
- [118] **Athanasiou, K. A., Niederauer, G. G. & Agrawal, C. M.**, 1996: Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials Polymer Scaffolding and Hard Tissue Engineering*, Vol. 17, pp. 93-102.
- [119] **Yang, F. et al.**, 2006: Poly(l,l-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 91, pp. 3065-3073.
- [120] **Ray, S.S.**, 2013: *Environmentally Friendly Polymer Nanocomposites*, Woodhead Publishing, UK.

- [121] **Bostman, O., Partio, E., Hirvensalo, E. & Rokkanen, P.**, 1992: Foreignbody reactions to polyglycolide screws. *Acta Orthopaedica*, Vol. 63, pp. 173 - 176.
- [122] **Ogunsona, E.O.**, 2007: Supercritical CO<sub>2</sub> foamed biodegradable polymer blends of polycaprolactone and mater-BI, MSc. Thesis, Universty of North Texas, pp. 15.
- [123] **Jenkins, M. J. & Harrison, K. L.**, 2008: The effect of crystalline morphology on the degradation of polycaprolactone in a solution of phosphate buffer and lipase. *Polymers for Advanced Technologies* Vol. 19, pp. 1901-1906.
- [124] **Hongfan, S., Lin, M., Cunxian, S., Xiumin, C. & Pengyan, W.**, 2006: The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials* Vol. 27, pp. 1735-1740.
- [125] **McDevitt, T. C., Woodhouse, K. A., Hauschka, S. D., Murry, C. E. & Stayton, P. S.**, 2003: Spatially organized layers of cardiomyocytes on biodegradable polyurethane films for myocardial repair. *Biomed Mater Res A* Vol. 66, pp. 586-595.
- [126] **Stankus, J. J., Guan, J. & Wagner, W. R.**, 2004: Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 70A, pp. 603-614.
- [127] **Heller, J. et al.**, 2000: Poly(ortho esters) : their development and some recent applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* Vol. 50, pp. 121-128.
- [128] **Chasin, M. & Langer, R.**, 1990: in *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, New York.
- [129] **Narayan, R.**, 2009: *Biomedical Materials*, pp. 426, NY, Springer Science + business media.
- [130] **LeGeros, R. Z.**, 2002: Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, Vol. 395, pp. 81-98.
- [131] **Petite, H, Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemin, G.**, 2000: Tissue-engineered bone regeneration, *Nature Biotech.*, Vol. 18, pp. 959-963.
- [132] **Quarto, R. , Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., Marcacci, M.**, 2001: Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells, *New Eng. J. Med.*, Vol. 344, pp. 385-386.
- [133] **Yoshikawa, T., Ogushi, H., Uemura, T., Nakajima, H., Ichijima, K., Tamai, S., Tateisi, T.**, 1998: *Biomed. Mater. Eng.*, Vol. 5, pp. 311.
- [134] **Adams, C. S., Mansfield, K., Perlot, R. L., Shapiro, I. M.**, 2001: Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, 20316.
- [135] **Boyde A., Corsi A., Quarto R., Cancedda R., Bianco P.**, 1999: Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism, *Bone*, Vol. 24, pp.579-589.
- [136] **Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H.**, 2002: Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo, *J. BiomedMater Res.*, Vol. 59, pp. 110-117.

- [137] **Oonishi H.**, 1991: Orthopaedic applications of hydroxyapatite, *Biomaterials*, Vol. 12, pp. 171-178.
- [138] **Tuli, P., Farbod, F., Beal, B., Jackson, IT.**, 2012: The use of hydroxyapatite granules for the correction of skeletal facial deformities, *European Journal of Plastic Surgery*, Vol. 35, pp. 203-208.
- [139] **Wei, GB., Ma, PX.**, 2004: Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 4749-57.
- [140] **Ohsawa K., Neo M, Matsuoka H, Akiyama H, Ito H, Kohno H, Nakamura T.**, 2000: The expression of bone matrix protein mRNAs around beta-TCP particles implanted into bone, *J Biomed Mater Res.*, Vol. 52, pp. 460-466.
- [141] **Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, Inoue H, Irie H, Endo N.**, 2005: Bone formation and resorption of highly purified beta-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle, *Biomaterials*. Vol. 26, pp. 5600-5608.
- [142] **Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A.**, 2006: Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws, *Int J Oral Maxillofac Surg.*, Vol. 35, pp. 708-13.
- [143] **Knabe, C, Koch, C, Rack, A. Stiller, M**, 2008: Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans, *Biomaterials*. Vol. 29, pp. 2249-58.
- [144] **Dong. J, Uemura, T, Shirasaki, Y., Tateishi, T., 2002:** Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells, *Biomaterials*. Vol. 23, pp. 4493-502.
- [145] **Suárez-González D1, Lee JS, Lan Levengood SK, Vanderby R Jr, Murphy WL.**, 2012: Mineral coatings modulate  $\beta$ -TCP stability and enable growth factor binding and release, *Acta Biomater*. Vol. 8, pp. 1117-1124.
- [146] **Hench, LL**, 1991: Bioceramics: From Concept to Clinic, *Journal of the American Ceramic Society*, Vol. 74, pp. 1487-1510.
- [147] **Kokubo, T**, 1991: Bioactive glass ceramics: properties and applications, *Biomaterials*, Vol. 12, pp. 155–163.
- [148] **Hench, LL, Splinter, RJ, Allen, WC, Greenlee, TK, 1971:** Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 5, pp. 117–141.
- [149] **Wilson, J, Pigott, GH, Schoen, FJ, Hench, LL,** 1981: Toxicology and biocompatibility of bioglasses, *J Biomed Mater Res.* Vol. 15, pp. 805-17.
- [150] **Shirtliff, VJ, Hench, LL,** 2003: Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair, *Journal of Materials Science*, Vol. 38, pp. 4697-4707.
- [151] **Geim, A., Novoselov, K. S.**, 2007: The rise of graphene, *Nature Materials*, Vol. 6, pp. 183–191.
- [152] **Novoselov, K. S., Geim, A.; Morozov, S. V.; Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., Firsov, A. A., 2004:** Electric field effect in atomically thin carbon films *Science*, Vol. 306, pp. 666–669.

- [153] **Mouras, S.; Hamm, A.; Djurado, D.; Cousseins, J.-C.**, 1987: *Revue de Chimie Minérale*, Vol. 24, pp. 572–582.
- [154] **Shioyama, H.**, 2001: Cleavage of graphite to graphene. *Journal of Materials Science Letters*, Vol. 20, pp. 499–500.
- [155] **Calandra, P.; Calogero, G.; Sinopoli, A.; Gucciardi, P. G.** 2010: *International Journal of Photoenergy* 2010, pp. 1–15.
- [156] **Sharma, B.; Frontiera, R. R.; Henry, A.-I.; Ringe, E.; Van Duynne, R. P.** 2012: *Materials, applications, and the future Materials Today*. Vol. 15, pp. 16–25.
- [157] **Novoselov, K. S., Fal'ko, V. I., Colombo, L., Gellert, P. R., Schwab, M. G., Kim, K.**, 2012: A roadmap for graphene, *Nature*, Vol. 490, pp. 192–200.
- [158] **Liu, Z., Robinson, J. T., Tabakman, S. M., Yang, K., Dai, H.**, 2011: Carbon materials for drug delivery & cancer therapy, *Materials Today*, Vol. 14, pp. 316–323.
- [159] **Mayorov, A. S.; Gorbachev, R. V.; Morozov, S. V.; Britnell, L.; Jalil, R.; Ponomarenko, L. A.; Blake, P.; Novoselov, K. S.; Watanabe, K.; Taniguchi, T.; Geim, A. K.**, 2011: *Nano Letters*, Vol. 11, pp. 2396–2399.
- [160] **Du, X.; Skachko, I.; Barker, A.; Andrei, E. Y.**, 2008: Approaching ballistic transport in suspended graphene, *Nature Nanotechnol.* Vol. 3, pp. 491–495.
- [161] **Balandin, A. A.**, 2011: Thermal properties of graphene and nanostructured carbon materials, *Nature Materials*, Vol. 10, pp. 569–581.
- [162] **Kuzmenko, A. B.; van Heumen, E.; Carbone, F.; van der Marel, D.**, 2008: Universal Optical Conductance of Graphite. *Physical Review Letters*, 100, 117401.
- [163] **Nair, R. R.; Blake, P.; Grigorenko, A. N.; Novoselov, K. S.; Booth, T. J.; Stauber, T.; Peres, N. M. R.; Geim, A. K.**, 2008: Fine Structure Constant Defines Visual Transparency of Graphene. *Science*, Vol. 320, pp. 1308.
- [164] **Sun, Y.; Wu, Q.; Shi, G.** 2011: Graphene based new energy materials, *Energy & Environmental Science*, Vol. 4, pp. 1113–1132.
- [165] **Chen, D.; Zhang, H.; Liu, Y.; Li**, 2013: Graphene and its derivatives for the development of solar cells, photoelectrochemical, and photocatalytic applications *J. Energy & Environmental Science*, Vol. 6, pp. 1362–1387.
- [166] **Lee, C.; Wei, X.; Kysar, J. W.; Hone, J.** 2008: Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene *Science*, Vol. 321, pp. 385–388.
- [167] **Petersen, K. E.**, 1982: Silicon as a mechanical material, *Proceedings of the IEEE*, Vol. 70, pp. 420–457.
- [168] **Yajima, S.; Hayashi, J.; Omori, M.; Okamura, K.**, 1976: Development of a silicon carbide fibre with high tensile strength *Nature*, Vol. 261, pp. 683–685.
- [169] **Wei, X.; Wang, M.-S.; Bando, Y.; Golberg, D.**, 2010: In-situ Tests on Individual Multi-Walled Boron Nitride Nanotubes, *Advanced Materials*, Vol. 22, pp. 4895–4899.

- [170] **Yu, M.**, 2000: Strength and Breaking Mechanism of Multiwalled Carbon Nanotubes Under Tensile Load, *Science*, Vol. 287, pp. 637–640.
- [171] **Treacy, M. M. J.; Ebbesen, T. W.; Gibson, J. M.**, 1996: Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes *Nature*, Vol. 381, pp. 678–680.
- [172] **Alzari, V.; Nuvoli, D.; Sanna, R.; Scognamillo, S.; Piccinini, M.; Kenny, J. M.; Malucelli, G.; Mariani, A. J.**, 2011: *Mater. Chem.*, Vol. 21, pp. 16544.
- [173] **Guo, P.; Song, H.; Chen, X.**, 2010: Hollow graphene oxide spheres self-assembled by W/O emulsion, *J. Mater. Chem.*, Vol. 20, pp. 4867.
- [174] **Yang, H.; Li, F.; Shan, C.; Han, D.; Zhang, Q.; Niu, L.; Ivaska, A.**, 2009: Covalent functionalization of chemically converted graphene sheets *viasilane* and its reinforcement *J. Mater. Chem.*, Vol. 19, pp. 4632.
- [175] **Cai, D.; Song, M.**, 2010: Recent advance in functionalized graphene /polymer nanocomposites, *J. Mater. Chem.*, Vol. 20, pp. 7906.
- [176] **Park, S.; Ruoff, R. S.**, 2009: Chemical methods for the production of graphenes, *Nat. Nano.*, Vol. 4, pp. 217.
- [177] **Brodie, B. C.**, 1859: *Philos. Trans. R. Soc. London*, Vol. 149, pp. 249.
- [178] **Staudenmaier, L.** 1898: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, Vol. 31, pp. 1481.
- [179] **Hummers, W. S.; Offeman, R. E.**, 1958: Preparation of graphitic oxide, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 80, pp. 1339.
- [180] **Marcano, D. C.; Kosynkin, D. V.; Berlin, J. M.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Alemany, L. B.; Lu, W.; Tour, J. M.**, 2010: Improved Synthesis of Graphene Oxide, *ACS Nano*, Vol. 4, pp. 4806.
- [181] **Dreyer, D. R.**, 2010: The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, Vol. 39, pp. 228–240.
- [182] **Koratkar, A.N.**, 2013: *Graphene in Composite Materials: Synthesis, Characterization and Applications*, pp. 164, Pennsylvania, DEStechPublication.
- [183] **Das, TK., Prusty, S.**, 2013: Recent advances in applications of graphene, *International Journal of Chemical Sciences and Applications*, Vol. 4, pp. 39-55.
- [184] **Mazaheri, M, Akhavan, O., Simchi, A.**, 2014: Flexible bactericidal graphene oxide–chitosan layers for stem cell proliferation, *Applied Surface Science*, Vol. 301, pp. 456-462.
- [185] **Pinto, A.M., Martins, J., Moreira, J.A., Mendes, A.M., Magalhaes, F.D.**, 2013: Dispersion of graphene nanoplatelets in PVAc latex and effect on adhesive bond strength, *Polym. Int.*, Vol. 62, pp. 928-935.
- [186] **Chang Y, Yang ST, Liu JH, Dong E, Wang Y, Cao A, Liu Y, Wang H.**, 2011: In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells *Toxicol Lett.*, pp. 201-210.
- [187] **Sun X, Liu Z, Welsher K, Robinson JT, Goodwin A, Zaric S, Dai H.**, 2008: Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery, *Nano Res.*, Vol. 1, pp. 203-212.
- [188] **Das, TK., Prusty, S.**, 2013: Graphene-Based Polymer Composites and Their Applications, *Polymer-Plastics Technol and Engineering*, Vol. 52, pp. 319–331.

- [189] **Kalbacova, M., Broz, A., Kong, J., Kalbac, M.**, 2010: Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells, *Carbon*, Vol. 48, pp. 4323-4329.
- [190] **Pinto, A.M., et. al.**, 2013: Biocompatibility of poly(lactic acid with incorporated graphene-based materials, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 104, pp. 229-238.
- [191] **Pan, Y., Wu, T., Bao, H., Li, L.**, 2011: Green fabrication of chitosan films reinforced with parallel aligned graphene oxide. *Carbohydr. Polym.* Vol. 83, pp. 1908-1915.
- [192] **Song, P., Cao, Z., Cai, Y., Zhao, L., Fang, Z., Fu, S.**, 2011: Fabrication of exfoliated graphene-based polypropylene nanocomposites with enhanced mechanical and thermal properties, *Polymer*, Vol. 52, pp. 4001-4010.
- [193] **Cao, Y., Feng, J., Wu, P.**, 2010: Preparation of organically dispersible graphene nanosheet powders through a lyophilization method and their poly(lactic acid) composites, *Carbon* Vol. 48, pp. 3834-3839.
- [194] **Mikos, A. G.; Lu, L.; Temenoff, J. S. & Temmser, J. K.**, 2004: Synthetic Bioresorbable polymer scaffolds. In: *An introduction to material in medicine*, Ratner B D, Hoffman A. S, Schoen F J, Lemons J E, (Ed.). pp 743, Elsevier Academic Press. USA.
- [195] **Subia,B., Kundu, J., Kundu, S.J.**, 2010: Tissue Engineering, *Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications*, pp. 142. DOI: 10.5772/8581.
- [196] **Ma, P. X. & Langer, R.**, 1999: Fabrication of biodegradable polymer foams for cell transplantation and tissue engineering. In *Tissue Engineering Methods and Protocols*, Morgan, J., and Yarmush, M. (eds.) Humana Press, NJ, pp.47.
- [197] **Lu, L.; Peter, S.; Lyman, M.; Lai, H.; Leite, S.; Tamada, J.; Uyama, S.; Vacanti, J.; Langer, R. & Mikos, A.**, 2000: In vitro and in vivo degradation of porous poly (DL-lactic-coglycolic acid) foams. *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 1595-1605.
- [198] **Pliikk, P.; Målberg, S. & Albertsson A. C.**, 2009: Design of resorbable porous tubular copolyester scaffolds for use in nerve regeneration. *Biomacromolecules*, Vol. 10, pp. 1259-64.
- [199] **Harris LD, Kim B.S, Mooney DJ.**, 1998: Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol.42, pp. 396-402.
- [200] **Singh L, Kumar V, Ratner B.D.**, 2004: Generation of porous microcellular 85/15 poly (dl-lactide-coglycolide) foams for biomedical applications. *Biomaterials*, Vol.25, pp. 2611-2617.
- [201] **Wang X, Li W, Kumar V.**, 2006: A method for solvent-free fabrication of porous polymer using solidstate foaming and ultrasound for tissue engineering applications. *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 1924-1929.
- [202] **Sachlos, E. & Czernuszka, J. T.**, 2003: Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid free from fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European cells and materials*. Vol. 5, pp. 29-40.
- [203] **Krause B, Diekmann K, van der Vegt NFA, Wessling M.**, 2002: Open nanoporous morphologies from polymeric blends by carbon dioxide foaming. *Macromolecules*, Vol. 35, pp. 1738-1745.

- [204] **Krause B, Koops GH, van der Vegt NFA, Wessling M, Wubbenhorst M, van Turnhout J.**, 2002: Ultralow-k dielectrics made by supercritical foaming of thin polymer films. *Advanced Materials*, Vol.14, pp.1041.
- [205] **Krause B, Sijbesma HJP, Munuklu P, van der Vegt NFA, Wessling M.**, 2001: Bicontinuous nanoporous polymers by carbon dioxide foaming. *Macromolecules*, 34, pp. 8792-8801.
- [206] **Huang, Y. C. & Mooney, D. J.**, 2005: Gas foaming to fabricate polymer scaffolds in tissue engineering. In: *Scaffoldings in tissue engineering*, pp. 159, Taylor and Francis group. CRC press, 2006, 61-72.
- [207] **Nam YS, Park TG.**, 1999: Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. *Biomaterials*. Vol. 20. pp. 1783–1790.
- [208] **Shao JD, Chen C, Wang YJ, Chen XF, Du C.**, 2012: Early stage structural evolution of PLLA porous scaffolds in thermally induced phase separation process and the corresponding biodegradability and biological property. *Polym Degrad Stabil.*, Vol. 97, pp.955–963.
- [209] **O'Brien FJ.**, 2011: Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Mater Today.*, Vol.14, pp. 88–95.
- [210] **Ma PX.**, 2004: Scaffolds for tissue fabrication. *Mater Today.*, Vol. 7, pp.30–40.
- [211] **Smith, L. A.; Beck, J. A. & Ma, P. X.**, 2006: Nano fibrous scaffolds and their biological effects. In: *Tissue Cell and Organ Engineering*, Kumar, C. (Ed.), pp 195, Wiley-VCH.
- [212] **Reneker DH, Chun I.**, 1996: Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*. Vol. 7, pp. 216–223.
- [213] **Lu, T., Li, Y., Chen, T.**, 2013: Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 8, pp. 337-350.
- [214] **Boudriot U, Dersch R, Greiner A, Wendorff JH.**, 2006: Electrospinning Approaches Toward Scaffold Engineering, A Brief Overview. *Artificial Organs*, Vol.30, pp. 785-792.
- [215] **Mandal, B. B. & Kundu, S. C.**, 2009: Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 2956-2965.
- [216] **Qiang, Lv., Feng, Q.**, 2006: Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique. *Journal of materials science. Materials in medicine*, Vol. 17, pp. 1349–56.
- [217] **Boland, E. D.; Espy, P. G. & Bowlin, G. L.**, 2004: Tissue engineering scaffolds. In *Encyclopaedia of Biomaterials and biomedical engineering*. Wenk G. E.; Bowlin, G. L. (Edi). pp 1633-1635. Richmng, Verginia , USA.
- [218] **Gomes, M. E., Ribeiro, A. S., Malafaya, P. B., Reis, R. L., Cunha, A. M.**, 2011: A new approach based on injection moulding to produce biodegradable starch-based polymeric scaffolds: morphology, mechanical and degradation behaviour. *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 883-889.
- [219] **Gomes, M. E., Godinho, J. S., Tchalamov, D., Reis, R. L., Cunha, A. M.**, 2002: Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties *Mater. Sci. Eng. C.*, Vol. 20, pp. 19-26.

- [220] **Gomes, M. E., Godinho, J. S., Reis, R. L., Cunha, A. M.**, 2002: *J. Appl. Med. Polym.* Vol. 6, pp. 75.
- [221] **Malafaya, P. B., Gomes, M. E., Salgado, A. J., Reis, R. L.**, 2002: *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies*, 1st edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, pp. 201.
- [222] **Gomes, M. E., Malafaya, P. B., Reis, R. L.**, 2003: *Biopolymer Methods in Tissue Engineering*, in: *Methods in Molecular Biology Series*, A. P. Hollander, P. V. Hatton, Eds., The Humana Press Inc., Totowa, pp. 65.
- [223] **Gomes, M. M. E.**, 2004: A Bone Tissue Engineering strategy based on starch scaffolds and bone marrow cells cultured in a flow perfusion bioreactor.
- [224] **Lin, L.; Ju, S.; Cen, L.; Zhang, H. & Hu, Q.**, 2008: Fabrication of porous, TCP scaffolds by combination of rapid prototyping and freeze drying technology. Yi Peng, Xiaohong Weng (Eds.), pp. 88–91 *APCMBE 2008, IFMBE Proceedings 19*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [225] **Woodfield, T. B.; Guggenheim, M.; von Rechenberg, B.; Riesle, J.; van Blitterswijk, C. A. & Wedler, V.**, 2009: Rapid prototyping of anatomically shaped, tissue engineered implants for restoring congruent articulating surfaces in small joints. *Cell Prolif.* (4), pp. 485-497
- [226] **Kai, H.; Wang, X.; Madhukar, K. S.; Qin, L.; Yan, Y.; Zhang, R.; Wang, X.**, 2009: Fabrication of two-level tumor bone repair biomaterial based on rapid prototyping technique. *Biofabrication*, doi: 10.1088/1758-5082/1/2/025003.
- [227] **Hutmacher, D. W.**, 2001: Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues- state of the art and future perspectives. *J Biomat Sci. Polym. Ed.* Vol. 12, pp. 107-124.
- [228] **Gupta V.K., Yola, M.L., Atar, A., Ustundag, Z., Solak, A.O.**, 2013: A novel sensitive Cu(II) and Cd(II) nanosensor platform: Graphene oxide terminated p-aminophenyl modified glassy carbon surface, *Electrochimica Acta*, Vol.112, pp. 541-548.
- [229] **Aydın, H.M., Yang, Y., Kohler, T., El Haj, A., Muller, R., Pişkin, E.**, 2009: Interaction of Osteoblasts with Macroporous Scaffolds Made of PLLA/PCL Blends Modified with Collagen and Hydroxyapatite, *Advanced Engineering Materials*, Vol. 11, pp. 83-88,
- [230] **Depan, D., Girase, B., Shah, J.S., Misra, R.D.K.**, 2011: Structure–process–property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds, *Acta Biomater.* Vol. 7, pp. 3432–3445
- [231] **Fan, H., Wang, L., Zhao, K., Li, N., Shi, Z., Ge, Z., Jin, Z.**, 2010: Fabrication, mechanical properties, and biocompatibility of graphene-reinforced chitosan composites, *Biomacromolecules*, Vol. 11, pp. 2345–2351.
- [232] **Chen, G.Y., Pang, D.W.P., Hwang, S.M., Tuan, H.Y., Hu, Y.C.**, 2012: A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation, *Biomaterials*, Vol. 33, pp. 418–427.



- [233] **Li, N., Zhang, Q., Gao, S., Song, Q., Huang, R., Wang, L., Liu, L., Dai, J., Tang, M., Cheng, G.,** 2013: Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells, *Sci. Rep.* 3.
- [234] **Brekke, J. H.; Toth, J. M.,** 1998: Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res*, Vol. 43, pp. 380-398.
- [235] **Klawitter JJ, Hulbert SF.,** 1971: Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *J Biomed Mater Res.*, Vol. 2, pp. 161–229.
- [236] **Simske SJ, Ayers RA, Bateman TA.,** 1997: Porous materials for bone engineering, in porous materials for tissue engineering. In: Dixit D-MLaV, editor. *Porous materials for tissue engineering*. Enfield, NH: Transtech; pp. 151–82.
- [237] **Itala, AI, Ylanen, HO, Ekholm, C, Karlsson, KH, Aro, HT.,** 2001: Pore diameter of more than 100  $\mu\text{m}$  is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res*. Vol. 58, pp. 679–683.
- [238] **Tithi Dutta Roy, JLS, Ricci, JL, Dianne Rekow, E, Thompson, VP, Russell Parsons, J.,** 2003: Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res*. Vol. 66, pp. 283–91.
- [239] **Niyogi, S.; Bekyarova, E.; Itkis, M. E.; McWilliams, J. L.; Hamon, M. A.; Haddon, R. C.,** 2006: *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 128, pp. 7720–7721.
- [240] **Stankovich, S.; Piner, R. D.; Nguyen, S. T.; Ruoff, R. S.,** 2006: *Carbon*, Vol. 44, pp. 3342–3347.
- [241] **Xu, C.; Wu, X.; Zhu, J.; Wang, X.,** 2008: *Carbon*, Vol. 46, pp. 386–389.
- [242] **Van den Berg O, Capadona JR, Weder C.** 2007: Preparation of homogeneous dispersions of tunicate cellulose whiskers in organic solvents. *Biomacromolecules*, Vol. 8, pp. 1353–1357.
- [243] **Favaro, M. M.; Rego, B. T.; Branciforti, M. C.; Bretas, R. E.S.,** 2010: *J. Polym. Sci. Part: B. Polym. Phys.*, Vol. 48, pp. 113.
- [244] **Leelapornpisit, W.; Ton-That, M. T.; Perrin-Sarazin, F.; Cole, K. C.; Denault, J.; Simard, B.,** 2005: *J. Polym. Sci. Part: B. Polym. Phys.*, Vol. 43, pp. 2445.
- [245] **Xu, J. Z.; Chen, C.; Wang, Y.; Tang, H.; Li, Z. M.; Hsiao, B.S.,** 2011: *Macromolecules*, Vol. 44, pp. 2808.
- [246] **Guo, C., Ji, L., Li, Y., Yang, X. and Tu, Y.,** 2014: Crystallization behavior of spray-dried and freeze-dried graphene oxide/poly(trimethylene terephthalate) composites. *J. Appl. Polym. Sci.* Vol. 131, 40332.
- [247] **Zhang, J., Duan, Y., Sato, H., Tsuji, H., Noda, I., Yan, S., Ozaki, Y.,** 2005: Crystal Modifications and Thermal Behavior of Poly(L-Lactic Acid) Revealed by Infrared Spectroscopy, *Macromolecules*, Vol. 38, pp. 8012- 8021.
- [248] **Pan, P., Zhu, B., Kai, W., Dong, T., Inoue, Y.,** 2008: Polymorphic Transition in Disordered Poly(L-Lactide) Crystals Induced by Annealing at Elevated Temperatures, *Macromolecules*, Vol. 41, pp. 4296-4304.
- [249] **Hua L, Kai W, Inoue Y.,** 2007: Synthesis and characterization of poly( $\epsilon$ -caprolactone)–graphite oxide composites. *J Appl. Polym Sci* Vol. 106, pp. 1880–1884.

- [250] **Kai WH, Hirota Y, Hua L, Inoue Y.**, 2008: Thermal and mechanical properties of a poly(epsilon-caprolactone)/graphite oxide composite. *J Appl Polym Sci*. Vol. 107, pp. 1395–1400.
- [251] **Cui, H., Sinko, P.J.**, 2012: The role of crystallinity on differential attachment/proliferation of osteoblasts and fibroblasts on poly(caprolactone-co-glycolide) polymeric surfaces, *Front. Mater. Sci.*, Vol. 6, pp. 47–59.
- [252] **Washburna, N. R., Yamada, K.M., Simon, C.G., Kennedy, S.B., Amisa, E.J.**, 2004: High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 1215–1224.
- [253] **Chen, H., Du, X., Yang, A., Yang, J., Huang, T., Zhang, N., Yang, W., Wang, Y., Zhang, C.**, 2014: Effect of graphene oxides on thermal degradation and crystallization behavior of poly(L-lactide), *RSC Adv.*, Vol. 4, pp. 3443.
- [254] **Can, E., Udenir, G., Kanneci, A.I., Kose, G., Bucak, S.**, 2011: Investigation of PLLA/PCL Blends and Paclitaxel Release Profiles, *AAPS PharmSciTech*, Vol. 12, DOI: 10.1208/s12249-011-9714-y
- [255] **Gibson LJ, Ashby MF.**, 1988: Cellular solids, structure and properties. Oxford, UK: Pergamon Press.

## ÖZGEÇMİŞ



**Ad Soyad** : Emre TEKAY  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Bursa / 31.07.1985  
**Adres** : Esentepe Mah. İstiklal Cad. No: 5/3 Nilüfer/BURSA  
**E-Posta** : emretekay@hotmail.com  
**Lisans** : Uludağ Üniversitesi / Kimya (2002-2007)  
**Yüksek Lisans** : Uludağ Üniversitesi / İşletme (2010-2012)  
Yalova Üniversitesi / Polimer Müh. (2012-2014)

### Mesleki Deneyim ve Ödüller:

Epsan Plastik / Proses Kalite Sorumlusu (2009-2010)  
BPO / Proses Mühendisi (2012-2013)  
Yalova Üniversitesi / Arş. Gör. (2013 - .... )

### Yayın ve Patent Listesi:

#### TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

■ Tekay, E., Ahi, B., Üstündağ, Z., Aydın, H.M., Tuzlakoğlu, K., 2014: Biyomedikal Uygulamalar İçin Grafen Katkılı Gözenekli Polimerik Yapıların Hazırlanması, VI. Fiziksel Kimya Kongresi, 5-8 Haziran, 2014 Denizli, Türkiye