



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

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN GÖZENEKLİ YAPI TASARIMI

DOKTORA TEZİ

Safa ŞENAYSOY

Makine Mühendisliği Anabilim Dalı

Makine Mühendisliği Doktora Programı

OCAK 2025

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

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN GÖZENEKLİ YAPI TASARIMI

DOKTORA TEZİ

Safa ŞENAYSOY

(172080203)

ORCID: 0000-0002-2982-3209

**Makine Mühendisliği Anabilim Dalı
Makine Mühendisliği Doktora Programı**

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin LEKESİZ

ORCID: 0000-0003-3350-1509

OCAK 2025



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

Bu tez, Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 211N025 ve 210ÖAP006 numaralı projeleri ile desteklenmiştir.

Bu tez, 123M960 ve 222M025 numaralı TÜBİTAK projeleri ile desteklenmiştir.

İNTİHAL BEYANI

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

Öğrencinin Adı Soyadı: Safa ŞENAYSOY

İmzası:

ÖNSÖZ

Bu doktora tezinin tamamlanmasında destekleriyle yanımda olan birçok değerli kişiye teşekkür etmek isterim.

Öncelikle, doktora sürecim boyunca bilgi ve deneyimleriyle her zaman yol gösteren ve destek olan danışman hocam Prof. Dr. Hüseyin LEKESİZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez izleme jürimde yer alarak değerli görüşleriyle katkı sağlayan Doç. Dr. Gökçe TANER ve Dr. Öğr. Üyesi Osman BAYRAK hocalarıma da minnettarım.

Tez çalışmamın hücre kültürü kısmında kullanmış olduğum hFOB 1.19 hücrelerini temin eden Prof. Dr. Vasıf Nejat HASIRCI'ya ve in vitro analizlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlayan Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı (BUMKAL) yöneticisi Prof. Dr. Ferda ARI'ya derin teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, in vitro deneylerin tasarımından yürütülmesine kadar her aşamada katkılarını esirgemeyen Dr. Sibel ÇINAR ASA'ya ve desteğiyle süreci kolaylaştıran İpek AYDIN'a minnettarım. Biyobozunma deneylerimdeki değerli yardımları için Arş. Gör. Recep İLHAN'a, mikro-BT analizlerinde uzmanlığını paylaşarak destek olan İstanbul Üniversitesi 3 Boyutlu Tıbbi ve Endüstriyel Tasarım Laboratuvarından (3B TETlab) İlknur ARVAS'a içten teşekkür ederim.

Doktora sürecimin her anında verdikleri dostluk ve motivasyonla yanımda olan kıymetli arkadaşlarım Doç. Dr. İzzet KIRKAYA, Dr. Öğr. Üyesi Emre DEMİRCİ ve Dr. Öğr. Üyesi Gökhan Barış SAKCALI'ya şükranlarımı sunarım. Tezimin son dönemlerinde manevi desteğiyle beni motive eden Op. Dr. Emine Sevilay ÇİFTÇİ'ye teşekkürlerimi iletmek isterim.

Son olarak, beni bugünlere getiren, her daim yanımda olan ve sevgileriyle bana güç veren canım annem Münevver ŞENAYSOY ve babam Hüsnü ŞENAYSOY'a sonsuz minnettarım. Onların desteği olmasaydı, bu noktaya ulaşmam mümkün olmazdı.

Bu tez, tüm bu değerli insanların katkılarıyla şekillenmiş ve onların emekleriyle zenginleşmiştir. Her birine gönülden teşekkür ederim.

Ocak 2025

Safa ŞENAYSOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	x
SEMBOLLER	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvi
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1 Doku İskeleleri	3
1.2 Doku İskelelerinde Kullanılan Malzemeler	5
1.3 Eklemeli Üretim ile Doku İskelelerinin Üretimi.....	7
1.3.1 Stereolitografi.....	7
1.3.2 Seçici lazer sinterleme	8
1.3.3 Laminalı üretim (LOM)	9
1.3.4 Ergiterek biriktirme yöntemi (FDM)	9
1.4 Kemik Dokusu.....	10
1.4.1 Kemik dokusunun yeniden yapılanması (Bone Remodeling).....	11
1.5 Literatür Araştırması	12
2. MATERYAL VE YÖNTEM	16
2.1 Çubuk Esaslı Doku İskelesi Tasarımı	16
2.2 Doku İskelesi Geometrilerinin 3 Boyutlu Yazıcıda Üretilmesi	19
2.3 Üretilmiş Doku İskelelerinin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleri	19
2.4 Mekanik Karakterizasyon	19
2.4.1 Doku iskelelerinin basma testi	20
2.5 Sonlu Elemanlar Yöntemi	20
2.5.1 Voxel tip mesh yapısı.....	21
2.5.2 Basma testinin sonlu elemanlar analizi.....	23
2.6 Periyodik Doku İskelelerinin Biyobozunma Davranışları	24
2.6.1 Biyobozunma davranışının birinci dereceden kinetik modeli.....	24
2.6.1.1 Birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinin sonlu elemanlar analizi algoritmasına entegre edilmesi.....	25
2.6.2 Difüzyon esaslı biyobozunma modeli.....	27
2.6.2.1 Difüzyon denkleminin sayısal yöntemlerle çözülmesi	28
2.6.3 Mekanik yük etkisi altında biyobozunma deneyleri	30
2.6.3.1 Biyobozunma deneylerinde kullanılan mekanik yüklerin üretimi.....	30
2.6.3.2 Biyobozunma deneyleri	31
2.7 In Vitro Analizler	34
2.7.1 PLA malzemesinin biyoyumluluğunun belirlenmesi.....	35

2.7.1.1 PLA malzemesinin ekstrakt çözeltilerinin hazırlanması.....	35
2.7.1.2 Sitotoksisite testlerinde kullanılan hücre hattı	36
2.7.1.3 Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan çözeltiler.....	36
2.7.1.4 Sitotoksisite testi için hücre kültürü.....	37
2.7.1.5 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi	38
2.7.1.6 Nötral kırmızı alım (NKA) yöntemi	38
2.7.2 İnsan osteoblast hücrelerinin (hFOB 1.19) çoğaltılması.....	38
2.7.3 Periyodik doku iskelelerinin sterilizasyonu	39
2.7.4 Periyodik doku iskelelerinin yüzey modifikasyonu ve hücre ekimi	39
2.7.4.1 hFOB 1.19 preosteoblast hücrelerinin çoğaltılması ve yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş periyodik doku iskelelerin üzerine ekilmesi.....	40
2.7.4.2 hFOB 1.19 hücrelerinin kaplanmış PLA malzemesi üzerindeki morfolojilerinin Phalloidin 488 sitoskelet boyaması ile tayini.....	40
2.7.5 Hücre ekimi ve mekanik yüklerin hücre ekimi gerçekleştirilmiş periyodik doku iskelelerine uygulanması	41
2.7.6 MTT canlılık analizi.....	42
2.7.7 İnsan osteoblast hücrelerinde (hfob 1.19) osteojenik farklılaşmanın sağlanması	43
2.7.8 Alkalen fosfataz enzim aktivitesi	43
2.7.9 BCA protein analizi	44
2.7.10 Mineralizasyon analizi	44
2.7.11 Mikro-BT taraması.....	45
2.8 Kemik Yeniden Yapılanma Modeli	46
2.9 In Silico Modelin Oluşturulması	48
2.10 İstatistiksel Analizler.....	49
3. BULGULAR	50
3.1 3 Boyutlu Yazıcıyla Üretilmiş Periyodik Doku İskelesi Geometrileri.....	50
3.2 Periyodik Doku İskelelerinin Mekanik Karakterizasyonu	51
3.3 Periyodik Doku İskelelerinin Sonlu Elemanlar Analizi.....	53
3.4 Periyodik Doku İskelelerinin Biyobozunma Davranışı	55
3.4.1 Birinci dereceden kinetik biyobozunma modeli	56
3.4.2 Difüzyon esaslı biyobozunma modeli.....	58
3.4.3 Biyobozunma deneyleri	60
3.5 In Vitro Analizler	64
3.5.1 PLA malzemesinin biyoyumluluk analizleri.....	64
3.5.1.1 MTT yöntemiyle sitotoksisitenin değerlendirilmesi	64
3.5.2 NKA yöntemiyle sitotoksisitenin değerlendirilmesi.....	66
3.5.3 Periyodik doku iskelelerinin yüzey modifikasyonunun değerlendirilmesi.....	67
3.5.3.1 MTT canlılık analiziyle yüzey modifikasyonlarının belirlenmesi	67
3.5.3.2 PLA malzemesi üzerindeki farklı kaplama malzemelerinin hücre morfolojisi üzerine etkileri.....	69
3.5.4 Hücre Canlılık Analizleri	70
3.5.5 Alkalen fosfataz enzim (ALP) aktivitesi.....	72
3.5.6 Mineralizasyon analizi	74
3.5.7 Mikro-BT analizi.....	75
3.6 In Silico Analiz.....	77
4. TARTIŞMA	83
4.1 Periyodik Doku İskelelerinin Mekanik Karakterizasyonu	83

4.2 Periyodik Doku İskelelerinin Biyobozunma Karakterizasyonu.....	85
4.3 Periyodik Doku İskelelerinin In Vitro Karakterizasyonu.....	91
4.4 Periyodik Doku İskelelerinin In Silico Model ile Karakterizasyonu	93
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	95
KAYNAKLAR	103
EKLER.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	154



KISALTMALAR

BC	: Basit K�p
BCS	: Hacim Merkezli Yapı
BCC	: Hacim Merkezli Kübik
FEM	: Sonlu Elemanlar Yöntemi
hFOB	: İnsan Osteoblast H�creti
SED	: Şekil Değiştirme Enerjisi Yoğunluğu

SEMBOLLER

E	: Elastisite Modülü
ρ	: Kemik Yoğunluğu
σ	: Gerilme
ε	: Birim Şekil Değişirme
ν	: Poisson Oranı
c	: Su Konsantrasyonu
λ	: Biyobozunma Katsayısı
α	: Difüzyon Katsayısı
β	: Malzeme Katsayısı
B	: Kemik Yapılanma Katsayısı
k	: Kemik Yapılanma Eşik Değeri
W_0	: Başlangıç Molekül Ağırlığı
W_{th}	: Eşik Molekül Ağırlığı

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1: Kemik doku iskelesinde kullanılan biyomalzemeler [5].....	6
Çizelge 2.1: Doku iskelesi tasarım parametreleri.....	17
Çizelge 2.2: Periyodik doku iskelelerinin fiziksel özellikleri.....	18
Çizelge 2.3: Birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinde kullanılan katsayılar [63].....	26
Çizelge 2.4: Difüzyon esaslı biyobozunma modelinde kullanılan katsayılar.....	30
Çizelge 2.5: Biyobozunma deneylerinde kullanılan periyodik doku iskelesi numune sayıları.....	32
Çizelge 2.6: Yüzey kaplama malzemeleri.....	40
Çizelge 2.7: Mikro-BT tarama parametreleri.....	46
Çizelge 3.1: Periyodik doku iskelelerinin eleman sayıları.....	54
Çizelge 3.2: MTT yöntemine göre pla malzemelerinin L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	65
Çizelge 3.3: NKA yöntemine göre pla malzemelerinin L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	66
Çizelge 3.4: Minerilizasyon sonrası periyodik doku iskelelerinin OD 570 nm sonuçları.....	75
Çizelge 3.5: Mineral resimlerindeki beyaz piksellerin sayısı.....	77
Çizelge 3.6: In silico modelde kullanılan katsayılar [65, 85].....	78

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: Kemik doku mühendisliği yaklaşımı [4].	2
Şekil 1.2: Doku mühendisliği yaklaşımını oluşturan temel faktörler [5].	2
Şekil 1.3: Doku iskelelerinden beklenen özellikler ve kullanılabilir malzeme ve üretim yöntemleri [9].	4
Şekil 1.4: Eklemeli üretim yöntemleri [23,24].	7
Şekil 1.5: Stereolitografi yöntemi [25].	8
Şekil 1.6: Seçici lazer sinterleme yöntemi [27].	8
Şekil 1.7: Laminalı üretim yöntemi [28].	9
Şekil 1.8: Ergiterek biriktirme yöntemi (FDM) [28].	10
Şekil 1.9: Sert (Cortical Bone) ve süngerimsi (Cancellous Bone) kemik [30].	11
Şekil 1.10: Kemik dokusunun yeniden yapılanma süreci [33].	12
Şekil 2.1: Çubuk esaslı birim doku iskelesi geometrileri.	16
Şekil 2.2: Çubuk esaslı birim doku iskelelerinin tasarım parametreleri.	17
Şekil 2.3: Periyodik doku iskelesi katı modelleri.	18
Şekil 2.4: Periyodik doku iskelesinin basma testi.	20
Şekil 2.5: Sonlu elemanlar yöntemi (FEM) [59].	21
Şekil 2.6: 3 boyutlu 8 düğüm noktalı hexahedron eleman [61].	21
Şekil 2.7: Uyluk kemiğinin bilgisayarlı tomografi (BT) görüntülerinden voxel mesh oluşturulması [62].	22
Şekil 2.8: BCS75 periyodik doku iskelesinin katı model ve mesh görüntüleri.	23
Şekil 2.9: Sonlu elemanlar analizindeki sınır şartları.	23
Şekil 2.10: Birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinin sonlu elemanlar kodlarıyla çalışma algoritması.	26
Şekil 2.11: Biyobozunma analizindeki sonlu elemanlar analizi sınır şartları.	27
Şekil 2.12: PLA Polimerinin kütleli (bulk) bozunması [64].	28
Şekil 2.13: 316 paslanmaz çelik ağırlıklar.	31
Şekil 2.14: Mekanik yük tutma aparatı.	31
Şekil 2.15: 4 N'luk mekanik yüklerin periyodik doku iskelelerine uygulanması.	31
Şekil 2.16: Periyodik doku iskelelerinin kurutma öncesi.	32
Şekil 2.17: Biyobozunma deneyleri.	33
Şekil 2.18: Periyodik doku iskelelerinin sterilizasyon aşamaları. a) periyodik doku iskeleleri, b) alkol sterilizasyonu, c) PBS ile yıkama, d) periyodik doku iskelelerin kurutulması, e) uv sterilizasyonu.	39
Şekil 2.19: Periyodik doku iskeleleri üzerine mekanik yükün uygulanması.	41
Şekil 2.20: 24 kuyucuklu hücre kültür kabının içindeki periyodik doku iskeleleri.	42
Şekil 2.21: SKYSCAN 1174 mikro-BT cihazı.	45
Şekil 2.22: In silico model [85].	48
Şekil 2.23: In silico modelde kullanılan malzeme tipleri.	49
Şekil 3.1: Üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskeleleri.	50
Şekil 3.2: Üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskelelerinin sem görüntüleri.	51

Şekil 3.3: Periyodik doku iskelelerinin kuvvet-yer değiştirme grafiği.....	51
Şekil 3.4: Periyodik doku iskelelerinin enerji-yer değiştirme grafiği.....	52
Şekil 3.5: Periyodik doku iskelelerinin spesifik enerji emilimi-spesifik yüzey alanı grafiği.	53
Şekil 3.6: Periyodik doku iskelelerinin mesh görüntüleri.	54
Şekil 3.7: Periyodik doku iskelelerinin rijitlik sonuçları.	55
Şekil 3.8: Periyodik doku iskelelerinin birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinden elde edilen rijitlik değerleri.	57
Şekil 3.9: Periyodik doku iskelelerinin difüzyon esaslı biyobozunma analizinden elde edilen rijitlik değerleri.	59
Şekil 3.10: Basit küp (BC) periyodik doku iskelesinin biyobozunma deney sonuçları a) su emilimi b) kütle kaybı c) rijitlik (* p<0,05).....	60
Şekil 3.11: Hacim merkezli yapı (BCS) periyodik doku iskelesinin biyobozunma deney sonuçları a) su emilimi b) kütle kaybı c) rijitlik (* p<0,05, ** p<0,005).	62
Şekil 3.12: Hacim merkezli kübik (BCC) periyodik doku iskelesinin biyobozunma deney sonuçları a) su emilimi b) kütle kaybı c) rijitlik (* p<0,05, ** p<0,005).	64
Şekil 3.13: MTT testinden elde edilen hücre canlılık sonuçları.	66
Şekil 3.14: NKA testinden elde edilen hücre canlılık sonuçları.....	67
Şekil 3.15: Farklı kaplama malzemeleriyle kaplanmış periyodik doku iskelelerinin MTT canlılık analizi sonuçları (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001, ****p <0.0001 ve ns;nonsignificant).....	68
Şekil 3.16: Yüzey modifikasyon malzemeleri (kollajen tip1, fibronektin, RGD peptit, BSA ve laminin) ile kaplanmış PLA plakalar üzerindeki hFOB 1.19 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.....	70
Şekil 3.17: Periyodik doku iskelesi üzerine ekilmiş hFOB 1.19 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.	71
Şekil 3.18: %50 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin canlılık analizi sonucu.....	71
Şekil 3.19: %75 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin canlılık analizi sonucu.....	72
Şekil 3.20: Alkalin fosfataz enzim aktivitesi standard eğrisi grafiği.....	73
Şekil 3.21: %50 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin ALP enzim aktivitesi sonuçları.	73
Şekil 3.22: %75 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin ALP enzim aktivitesi sonuçları.	74
Şekil 3.23: Mineral oluşumu sonrası alizarin kırmızısı s boyası ile boyanmış periyodik doku iskeleleri.....	74
Şekil 3.24: Mineralizasyon analizi sonrası doku iskelelerinin normalize edilmiş sonuçları.	75
Şekil 3.25: BCS periyodik doku iskelesinin mikro-BT taramasından elde edilen görüntüler.	76
Şekil 3.26: BCC periyodik doku iskelesinin mikro-BT taramasından elde edilen görüntüler.	76
Şekil 3.27: Periyodik doku iskelelerinin normalize piksel sayıları.	77
Şekil 3.28: In silico modelden elde edilen BC doku iskeleleri üzerindeki kemik yoğunluk dağılımları.	79
Şekil 3.29: In silico modelden elde edilen BCS doku iskeleleri üzerindeki kemik yoğunluk dağılımları.	80

Şekil 3.30: In silico modelden elde edilen BCC doku iskeleleri üzerindeki kemik yoğunluk dağılımları.	81
Şekil 3.31: In silico modelden elde edilen normalize edilmiş kemik kütlesi sonuçları.	82
Şekil 4.1: Periyodik doku iskelelerinin nümerik biyobozunma modellerinden elde edilen rijitlik sonuçları.	86
Şekil 4.2: %62,5 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin 500 günlük difüzyon esaslı biyobozunma analizi sonuçları.....	87
Şekil 4.3: Periyodik doku iskeleleri için difüzyon esaslı biyobozunma simülasyonu sonuçlarıyla deneysel sonuçların kıyaslanması.	88
Şekil 4.4: Normalize edilmiş sonuçlar.....	94



KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN GÖZENEKLİ YAPI TASARIMI

ÖZET

Doku mühendisliği yaklaşımı, konvansiyonel rejenerasyon cerrahisinin ciddi dezavantajları nedeniyle son yıllarda giderek artan bir öneme sahip olmuştur. Bu yaklaşımda, laboratuvar ortamında çoğaltılan hücreler, vücut içinde zamanla eriyen bir doku iskelesi üzerine ekilmekte ve doku oluşumunun ardından bu yapı hastaya implante edilmektedir. Ancak özellikle kemik dokunun iskele üzerindeki büyüme davranışı tam olarak modellenenmiş değildir. Kemik doku rejenerasyonu, mekanobiyolojik bir süreçtir. Buna karşın, bu alanda yapılan çalışmaların çoğunda biyolojik süreçlere odaklanılmış; mekanik yükün etkisi yalnızca deneysel olarak bilinen bir faktör şeklinde ele alınmıştır.

Doku iskelelerinden beklenen, yeterli mekanik dayanım sağlarken, besin ve atık difüzyonuna olanak tanıyacak kadar gözenekli olması, biyouyumluluk ve biyobozunabilirlik gibi temel özellikleri karşılamasıdır. Bu özelliklerin tasarım sürecinde eş zamanlı olarak değerlendirilmesi, ideal doku iskelesi tasarımını oldukça karmaşık hale getirmektedir.

Bu tez çalışmasında, farklı gözenek geometrileri ve oranlarının doku iskelelerinin biyobozunma davranışı ve kemik rejenerasyonu üzerindeki etkileri mekanik yük altında incelenmiştir. Çalışmada üç farklı gözenek geometrisine sahip doku iskelesi tasarlanmıştır:

1. Basit Küp (BC): Yalnızca yatay ve dikey çubuklardan oluşan yapı,
2. Hacim Merkezli Yapı (BCS): Yalnızca açılı çubuklardan oluşan yapı,
3. Hacim Merkezli Kübik (BCC): Hem yatay-dikey hem de açılı çubuklardan oluşan yapı.

Ayrıca, çubuk kesit ölçüleri değiştirilerek %50, %62,5 ve %75 gözenek oranlarına uygun tasarımlar gerçekleştirilmiştir. Bu sayede, kemik rejenerasyonunu etkileyen farklı rijitlik, spesifik yüzey alanı ve spesifik enerji emilimi değerlerine sahip doku iskeleleri elde edilmiştir.

Deneysel ve sonlu elemanlar analizleri sonucunda, BC doku iskelelerinin tüm gözenek oranlarında en yüksek rijitlik değerine sahip olduğu belirlenmiştir. En yüksek spesifik yüzey alanı değeri %75 gözenek oranına sahip BCC doku iskelesinde, en yüksek spesifik enerji emilimi ise %75 gözenek oranına sahip BCS doku iskelesinde elde edilmiştir.

Biyobozunma davranışını değerlendirmek için iki farklı nümerik model kullanılmış ve biyobozunma deneyleri 15, 30, 60, 90 ve 120 gün süreyle 4 N mekanik yük altında gerçekleştirilmiştir. Birinci dereceden kinetik model biyobozunmanın ikinci aşamasını, difüzyon esaslı model ise biyobozunmanın ilk aşamasını temsil etmektedir. Deneyler sonucunda mekanik yükün biyobozunma üzerinde etkisi olmadığı, doku

iskelelerinin mekanik özelliklerinde ve ağırlıklarında anlamlı bir değişim gözlenmediği belirlenmiştir. En yüksek su emilimi, 60. günde BCC doku iskelesinde gözlemlenmiş ve bu durum hücre ekimi ve tutunması açısından BCC doku iskelelerini avantajlı kılmıştır.

In vitro çalışmalar kapsamında, %50 ve %75 gözenek oranlarına sahip doku iskelelerinde 2 N mekanik yük altında hücre canlılığı ve ALP enzim aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiştir. %50 gözenek oranına sahip BCC doku iskelesine uygulanan mekanik yük, hücre canlılığını 18 kat artırırken, %75 gözenek oranına sahip BCS doku iskelesinde bu artış 6 kat olarak ölçülmüştür. Ancak BC doku iskelelerinde mekanik yükün canlılık üzerine etkisi bulunmamıştır. ALP enzim aktivitesi analizlerinde mekanik yükün etkisi gözlenmemiştir.

Mineralizasyon ve mikro-BT analizleri, %50 ve %75 gözenek oranlarına sahip BCS ve BCC doku iskelelerinde 1 N ve 2 N mekanik yük etkisi altında gerçekleştirilmiştir. En yüksek mineralizasyon, 2 N mekanik yük altında %75 gözenek oranına sahip BCC doku iskelesinde elde edilmiştir. Mikro-BT taramalarında ise en yüksek mineral miktarı, aynı yük altında %75 gözenek oranına sahip BCS doku iskelesinde gözlemlenmiştir.

Kemik rejenerasyonu açısından mekanik yükün, spesifik yüzey alanının ve spesifik enerji emilimi değerlerinin önemli etkileri olduğu in vitro analizlerle doğrulanmıştır. Ayrıca, farklı tasarım parametrelerinin etkilerini nümerik olarak değerlendirmek amacıyla in silico bir model geliştirilmiştir. Bu model, sonlu elemanlar yöntemine dayanmakta ve kemik yapılanma modeli için elemanlardaki şekil değiştirme enerjisi yoğunluğunu temel almaktadır. Modelde kullanılan katsayılar, mineralizasyon ve mikro-BT analizlerinden elde edilen normalize sonuçlarla belirlenmiş ve in vitro analiz sonuçlarıyla uyumlu hale getirilmiştir. Böylelikle in silico modelde kemik dokusunun gelişimi modellenmiştir.

Sonuç olarak, farklı tasarım parametrelerine sahip doku iskelesi tasarımları, mekanik dayanım, biyobozunma, in vitro ve in silico analizlerle değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar spesifik yüzey alanı ve spesifik enerji emilimi değerlerinin doku iskelesi uygulamalarında başarının sağlanmasında kritik öneme sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kemik dokusu, Doku iskelesi, Mekanik özellikler, Biyobozunma, In vitro analizler, In silico analizler.

DESIGN OF POROUS STRUCTURE FOR BONE TISSUE ENGINEERING

SUMMARY

Tissue engineering approaches have gained increasing importance in recent years due to the significant drawbacks of conventional regenerative surgery. In this approach, cells cultured in a laboratory environment are seeded onto a biodegradable scaffold and implanted into the patient after tissue formation. However, the growth behavior of bone tissue on scaffolds has not been fully modeled. Bone tissue regeneration is a mechanobiological process. Nevertheless, most studies in this field focus primarily on biological processes, considering mechanical loading merely as an experimentally acknowledged factor without investigating its mechanisms of action.

Tissue scaffolds are expected to provide adequate mechanical strength while allowing sufficient porosity for nutrient and waste diffusion, as well as fulfilling essential properties such as biocompatibility and biodegradability. Evaluating these features simultaneously during the design process significantly complicates the development of ideal tissue scaffolds.

In this thesis study, the effects of different pore geometries and porosity ratios on the biodegradation behavior and bone regeneration of tissue scaffolds were examined under mechanical loading. Three different pore geometries were designed:

1. Basic Cube (BC): Comprising only horizontal and vertical struts,
2. Body-Centered Structure (BCS): Comprising only diagonal struts,
3. Body-Centered Cubic (BCC): Comprising horizontal, vertical, and diagonal struts.

Additionally, scaffolds were designed with porosity ratios of 50%, 62.5%, and 75% by altering the cross-sectional dimensions of the struts. As a result, scaffolds with varying stiffness, specific surface area, and specific energy absorption values, which are directly influential in bone regeneration, were obtained.

Experimental and finite element analyses revealed that BC scaffolds exhibited the highest stiffness values across all porosity ratios. The highest specific surface area was observed in BCC scaffolds with a porosity of 75%, while the highest specific energy absorption was obtained in BCS scaffolds with the same porosity ratio.

To characterize the biodegradation behavior, two different numerical models were utilized, and biodegradation experiments were conducted under 4 N mechanical loading for 15, 30, 60, 90, and 120 days. The first-order kinetic model represented the second stage of biodegradation, while the diffusion-based model corresponded to the first stage, aligning with experimental results. The experiments demonstrated that mechanical loading had no significant effect on biodegradation, and the mechanical properties and weight of the scaffolds remained relatively unchanged. The highest

water absorption was observed on day 60 in BCC scaffolds, indicating an advantage for cell seeding and adhesion.

In vitro studies involved cell viability analysis and ALP enzyme activity measurements under 2 N mechanical loading for 50% and 75% porosity scaffolds. For 50% porosity, mechanical loading increased cell viability by 18 times in BCC scaffolds, whereas it led to 6 times increase in BCS scaffolds with 75% porosity. Mechanical loading had no significant effect on cell viability in BC scaffolds. Furthermore, ALP enzyme activity was unaffected by mechanical loading.

Mineralization and micro-CT analyses were conducted under 1 N and 2 N mechanical loading for BCS and BCC scaffolds with 50% and 75% porosity. The highest mineralization value was observed in BCC scaffolds with 75% porosity under 2 N loading, with the highest specific surface area. Similarly, micro-CT scans indicated that the highest mineral content was achieved in BCS scaffolds with 75% porosity under the same loading condition, with the highest specific energy absorption.

In vitro analyses confirmed the significant impact of mechanical loading, specific surface area, and specific energy absorption on bone regeneration. To numerically evaluate the effects of different design parameters, an in silico model was developed based on the finite element method. This model utilized strain energy density in elements representing bone tissue for bone remodeling. Coefficients used in the bone remodeling model were determined from normalized results obtained from mineralization and micro-CT analyses, ensuring consistency between in silico and in vitro findings. Thus, the development of bone tissue on scaffolds is modeled by using an in silico approach.

In conclusion, tissue scaffolds with different design parameters were assessed through mechanical testing, biodegradation experiments, and in vitro and in silico analyses for bone tissue engineering applications. The obtained results identified that specific surface area and specific energy absorption are critical parameters for the success of tissue scaffold applications.

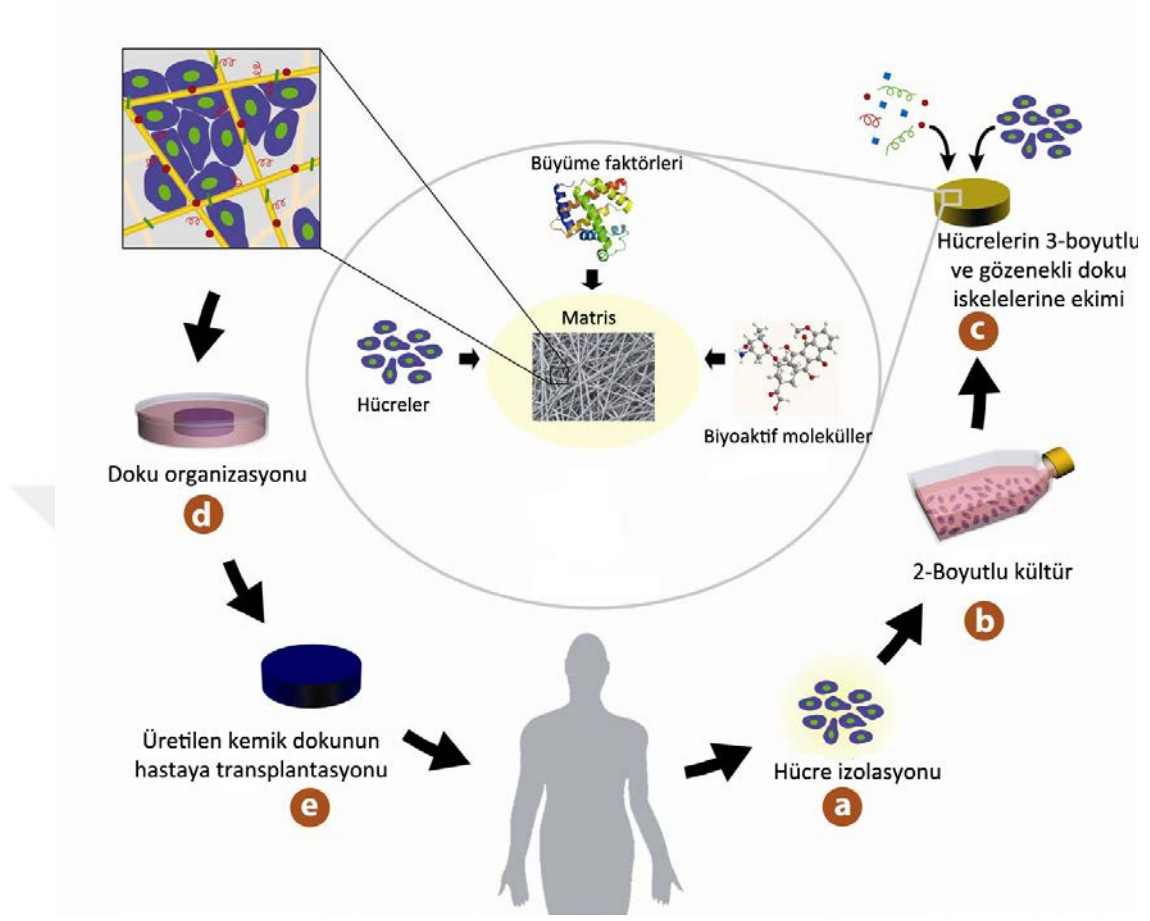
Keywords: Bone tissue, Tissue scaffold, Mechanical properties, Biodegradation, In vitro analysis, In silico analysis.

1. GİRİŞ

Kemik, organizmanın en sert ve temel yapısıdır ve yaşam süresince kendini yenileyen, değişen fonksiyonel ihtiyaçlara ve mekanik yüklere uyum sağlayıp yapısını değiştirebilen dinamik bir dokudur [1]. Fakat kanser, travma ya da kaza sonucu kemik dokularında meydana gelen büyük kusurlar kendi kendine iyileşmemektedir. Bu durumda kemik dokusunun tedavisinde geleneksel yöntem olarak bilinen tedavi yöntemleri (alografiler, ksenografiler, otografiler ve biyomedikal implantlar) kullanılarak yaşam kalitesi büyük ölçüde arttırılmaktadır fakat bu yöntemlerin uygulanması donör sayısındaki azlık, enfeksiyon riski, zayıf entegrasyon ve olası implant uyumsuzluğu gibi faktörlere bağlı olduğundan dolayı kısıtlıdır [2]. Örneğin, ABD’ de yapılan araştırmalara göre, 2015 yılında ABD’de organ nakli için bekleyen ortalama kişi sayısı, bağışlanan organ sayısından yaklaşık dört kat daha fazladır [3]. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için doku mühendisliği yaklaşımı geliştirilmiştir. “Doku mühendisliği” terimi ilk olarak 1987’de California Üniversitesi’nden Dr. Fung tarafından Birleşik Devletler Ulusal Bilim Kurumu’nda (National Science Foundation, NSF) gerçekleştirilen bir toplantıda kullanılmıştır. Doku mühendisliği, yapay organ ve/veya doku yaratmak ya da işlevini yitirmiş dokuların yenilenmesi sağlamak için malzeme ve mühendislik bilimini, yaşam bilimleri ile bir araya getiren disiplinler arası bir bilim dalıdır [3]. Doku mühendisliğinde temel prensip, hastadan veya başka bir vericiden alınan hücrelerin bir doku iskelesi üzerine ekilmesi, dokuların üç boyutlu olarak vücuttaki doğal formuna en uygun şekilde vücut dışında hücre/doku kültür ortamında üretilmesi, üretilen dokuların hasarlı dokuların yerine vücuda implante edilmesidir. Daha sonra doğal doku yenilenme süreci başlamakta, kan damarları yapının içine nüfus etmekte ve doku iskelesi bozunurken yerine yeni dokunun oluşmasına kılavuzluk etmektedir. Doku mühendisliğinin temel prensipleri Şekil 1.1’de verilmiştir ve şu şekilde özetlenebilir.

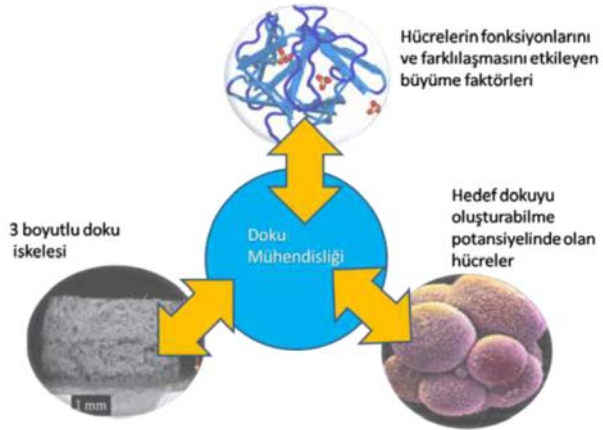
- a) Hücrelerin izole edilmesi
- b) Uygun hücre kültürü ortamında sayılarının çoğaltılması
- c) Büyüme faktörleri ile uygun bir doku iskelesine ekimi

- d) Doku iskelesinin kültür ortamına konması
- e) Hazırlanan dokunun hasarlı bölgeye transplantasyonu



Şekil 1.1: Kemik doku mühendisliği yaklaşımı [4].

Doku mühendisliği yaklaşımı ile doku yenilenmesinde bu bileşenlerin tekli veya çoklu kombinasyonlarının olduğu farklı durumlar vardır. İlk strateji doku yenilenmesinde sadece biyomalzemelerin kullanılmasıdır.



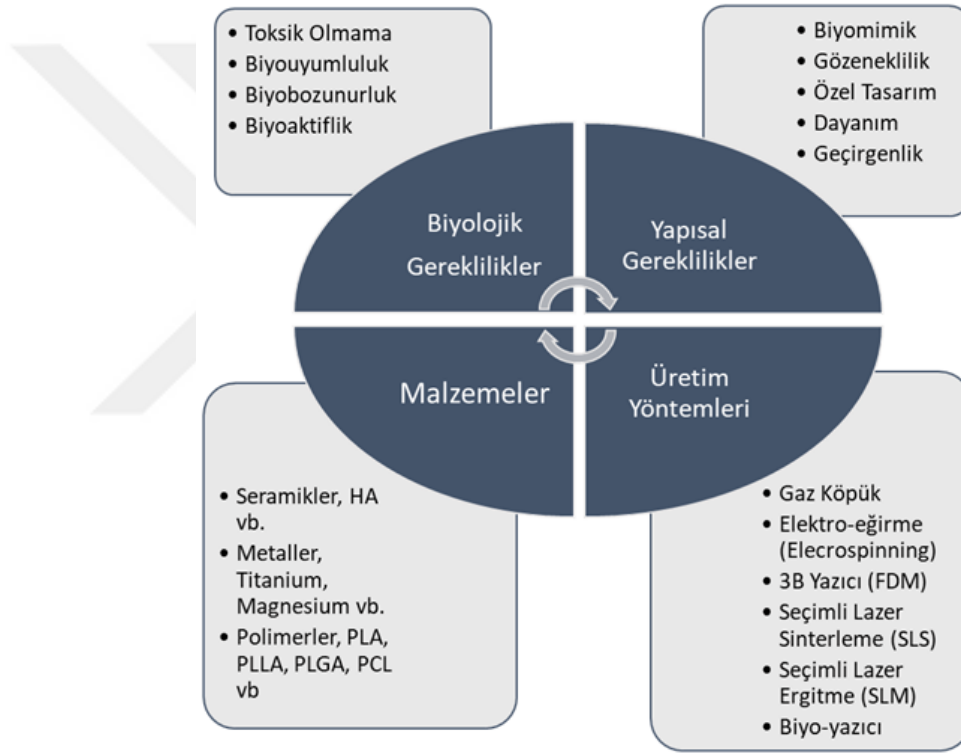
Şekil 1.2: Doku mühendisliği yaklaşımını oluşturan temel faktörler [5].

Burada, hazırlanan doku iskelelerinin hasarlı bölgeye direkt olarak yerleştirilmesi ile sağlıklı hücrelerin çoğalması için gerekli mikro çevrenin oluşturulması amaçlanmaktadır. İkinci stratejide uygun bir vericiden veya hastanın kendisinden alınan hücreler hasarlı bölgeye doğrudan enjekte edilmektedir. Üçüncü olarak ise hücrel aktiviteyi düzenleyen biyosinyal moleküller hasarlı dokuya enjekte edilmekte veya uygun biçimde (polimerik taşıyıcılara veya doku iskelelerine yüklenerek) yerleştirilmektedir. Ancak, bu yaklaşım doku kayıplarının büyük olduğu durumlarda yetersiz kalmaktadır. Doku mühendisliğindeki en çarpıcı ve üzerinde en çok çalışılan strateji ise doku iskeleleri ve büyüme faktörlerinin birlikte kullanıldığı yapıların hazırlanmasıdır. Hedeflenen doku yenilenmesi için çoğaltılan sağlıklı hücreler büyüme faktörleri ile gerçek doku mikro çevresini taklit eden üç boyutlu doku iskelelerine ekildikten sonra hasarlı bölgeye yerleştirilmektedir. Büyüme faktörleri varlığında farklılaşmasıyla doku yenilenmesi başlamakta ve sağlıklı hücrelerin kendilerine ait büyüme faktörlerini salgılamasıyla doku yenilenmesi devam etmektedir [5].

1.1 Doku İskeleleri

Doku iskeleleri hasarlı, hastalıklı ya da travmalı dokuların yenilenmesini veya yeni dokuların oluşturulmasını sağlar. Bu durum için doku iskeleleri ekilen hücrelerin tutunması, büyümesi ve fonksiyonlarını sürdürebilmesi için hücre dışı matris görevini görür. Doku iskelesinin temel görevi bir şablon oluşturarak hücre tutunması, büyümesi ve bütünleşmesi için gerekli mekanik ve geometrik yapıyı sağlamaktır. Doku iskelelerinden beklenen özellikler Şekil 1.3'te özetlenmiştir. Kemik doku iskelelerinden beklenen özelliklerden birisi besin ve oksijenin doku iskelesi üzerindeki kemik hücrelerine iletilebilmesi için yeterince gözenekli olmasıdır fakat gözeneklilik oranı çok yüksek olursa bu sefer de yeterince mekanik dayanım sergileyemeyecektir. Ayrıca, kemik dokusu mekanik yüklere de oldukça duyarlıdır ve kemik dokusunun yoğunluğu mekanik yüklerin geldiği doğrultuda daha fazladır. Böylelikle kemik dokusu değişen mekanik yüklere göre yoğunluğunu değiştirerek kendisini adapte edebilmektedir. Bu olaya literatürde kemik dokusunun yeniden yapılanması (Bone Remodeling) adı verilmektedir. Bu olay ilk olarak 1892'de Julius Wolff tarafından keşfedilmiştir ve Wolff kanunu olarak isimlendirilmektedir [6].

Buna göre doku iskelesi üzerinde bulunan kemik hücrelerinin büyüüp yoğunluğunu arttırabilmeleri için uygun gerilmeye de maruz kalmaları gereklidir. Biyolojik olgunun mekanik bir olguyla tetiklenmesi olayına mekanobiyolojik olay adı verilmektedir [7]. Kemik doku iskelelerinden beklenen başka bir özellikse doku iskeleleri üzerinde kemik dokusu oluşurken aynı zamanda doku iskelelerinin yok olmasıdır [8]. Bu durumda PLA, PLLA, PCL gibi biyobozunur polimer malzemeler yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu polimer malzemelerin bir diğer avantajı da 3 boyutlu yazıcılarda yaygın bir şekilde kullanılmasıdır. 3 boyutlu yazıcı teknolojisinin gelişmesiyle birlikte gözenek geometrisi ve oranı gibi farklı tasarım parametrelerine sahip doku iskelelerini üretebilmek mümkün hale gelmiştir.



Şekil 1.3: Doku iskelelerinden beklenen özellikler ve kullanılabilir malzeme ve üretim yöntemleri [9].

Doku iskelelerinin farklı tasarım parametrelerinin de kemik dokusunun yenilenmesi üzerine oldukça önemli etkisi vardır. Çünkü farklı tasarım parametrelerine sahip doku iskeleleri farklı rijitlik değerlerine sahip olacaklardır. Bu da doğrudan doku iskelelerinin şekil değiştirme enerjisini etkileyecektir. Mekanik uyarı seviyesi şekil değiştirme enerjisiyle doğrudan ilişkili olduğu için kemik yapılıması etkilenecektir [10-12]. Ayrıca doku iskelesi üzerinde kemik yapım süreci devam ederken doku iskelesi malzemesi de biyobozunmaya maruz kalarak mekanik özellikleri zayıflamaya

başlayacaktır. Bundan dolayı da şekil değiştirme enerjisi dağılımı da değişecek ve kemik yapılanmasını etkileyecektir. Sonuç olarak büyük kemik kusurlarına göre doku iskelesi tasarlamak birçok parametreyi eş zamanlı olarak değerlendirmeyi gerektirmektedir. Bu da uygun kemik doku iskelesi tasarımı yapmayı oldukça zorlaştırmaktadır ve bundan dolayı tam olarak klinik uygulamaya henüz geçilememiştir. Literatüre bakıldığı zaman tüm bu istenen özelliklerin bir arada ele alındığı çalışmalar oldukça azdır.

1.2 Doku İskelelerinde Kullanılan Malzemeler

Doku mühendisliğinde metaller, seramikler, polimerler (doğal ve sentetik) ve bunlardan oluşan kompozit malzemeler kullanılmaktadır. Fakat kullanılan her malzemenin avantaj ve dezavantajları vardır. Metaller genellikle biyobozunur olmadıkları ve işlenebilirlikleri sınırlı olduğu için doku iskelesi uygulamalarında kullanımları sınırlıdır. Seramikler ise çeki yüklerine karşı dirençleri düşük ve kırılğan yapıya sahip oldukları için eğilme ve çeki gibi yüklere maruz kalacakları yerlerde kullanılamamaktadır. Bu iki malzemeye karşılık ihtiyaç duyulan özelliklere göre bileşimleri ve yapıları ayarlanabilen polimerler oldukça üstün tasarım esnekliğine sahiptir. Bu yüzden doku iskelesi üretiminde polimer malzemeler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Üretilen doku iskeleleri hem kimyasal yapı hem de fiziksel yapı olarak hücre dışı matris ortamına mümkün olduğunca benzemek zorundadır. Deri, tendon, ligament, göz, kan damarları ve kalp kapakçıkları gibi yumuşak dokuyu oluşturacak doku iskeleleri polimerlerden, kemik gibi sert dokuyu oluşturacak doku iskeleleri ise seramikler, polimerler veya kompozit malzemelerden oluşur [5].

Kemik dokusunda kullanılacak doku iskelelerinde yapının osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerinin yüksek olması istenmektedir. Osteoindüktif varlığında hücre farklılaşması meydana gelmekte ve kemik oluşumu gözlenmektedir. Osteokondüktif özellik ise hücrelerin çoğalmasına bağlı olarak üç boyutlu kemik yapısını oluşturmada etkilidir. Ayrıca kemik doku mühendisliğinde kullanılacak doku iskelesinin belirli mekanik dayanım değerine sahip olması gerekmektedir [5]. Kemik doku iskelesinin sahip olması gereken bir diğer özellik de biyobozunur olmasıdır. Hücreler çoğalıp hücre dışı matrisi oluşturduğu zaman doku iskelesinin vücutta bozunabilmesi gerekmektedir. Bu nedenle kemik doku iskelelerinde metaller ve seramikler çok az kullanılırken doğal ve sentetik biyobozunur polimerler daha fazla

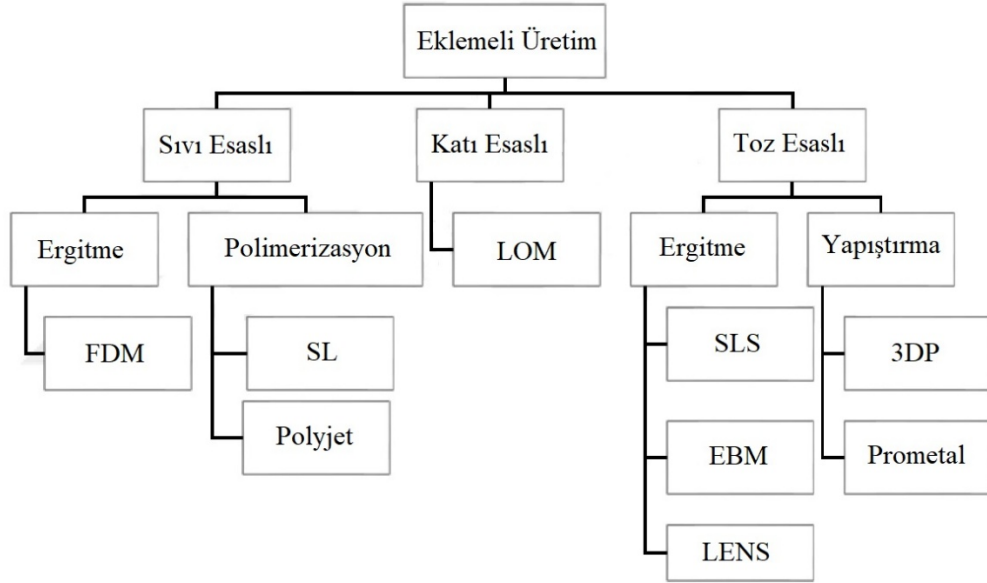
tercih edilmektedir. Kemik doku iskelesi uygulamalarında doğal polimerler olarak kollajen, jelatin, kitosan ve aljinat gibi yapılar kullanılırken sentetik polimerlerden poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), poli laktik asit (PLA), polikaprolakton (PCL), polipropilenfumerat (PPF) kullanılmaktadır. Kemik doku iskelesi çalışmalarında kullanılan biyomalzeme ve özellikleri Çizelge 1.1’de verilmiştir [5].

Çizelge 1.1: Kemik doku iskelesinde kullanılan biyomalzemeler [5].

Doku İskelesi Malzemesi	Özellikleri
Kitosan [13]	Üç boyutlu ve kemik doku mühendisliğine yönelik olarak osteokondüktif özelliğe sahip Gözenek Boyutu: 100 µm
Kondroit sülfat-kitosan [14]	Kondroit sülfat ile kitosan arasında oluşan iyonik etkileşime bağlı doku iskelesi üretimi
Polipropilen [15]	Farklı çapraz bağlanma oranlarında hidrojel yapıda 20-60 kPa mekanik dayanım
Brushite-kitosan [16]	Kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak yüksek resorpsiyon kapasitesine sahip doku iskeleleri Ortalama gözeneklilik oranı: %53.1 Ortalama gözenek boyutu: 10-100 µm
Kitosan-aljinatnanohidroksiapatit [17]	Kitosan jelatin ve nano yapıda hidroksiapatitten oluşan kompozit yapı Nanopartikül eklenmesi ile doku iskelelerinin yoğunluğunu arttırmakta Nano yapıda hidroksiapatit eklenmesi su tutuma kapasitesini azaltmakta Ortalama gözenek boyutu: 150-350 µm
Poli-d-laktik asit/Aljinat [18]	Kontrollü salım sistemine yönelik farklı degradasyon hızlarına sahip polimerlerden oluşan yapı Ortalama gözenek boyutu: 250 µm Ortalama gözeneklilik: %70
PHBV/PLGA [19]	Ortalama gözeneklilik: %30-81 Mekanik dayanım: 1-1.12 MPa
PHB/Kitosan [20]	Ortalama gözeneklilik: %70 Mekanik dayanım: 13.07±0.014 MPa
Kitosan-jelatin-nanoSiO2 [21]	İçsel bağlantılı, 250-400 µm gözenek boyut dağılımına sahip, 0.3-1 MPa mekanik dayanım

1.3 Eklemeli Üretim ile Doku İskelelerinin Üretimi

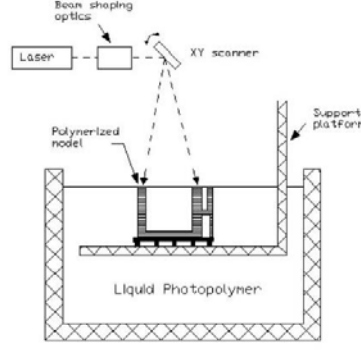
Eklemeli üretim ile serbest katı hal teknikleri, geleneksel yöntemlerle üretilemeyecek karmaşıklığıdaki parçaları üretmek için geliştirilmiştir [22]. Eklemeli üretim, bilgisayar destekli tasarım (CAD), bilgisayarlı tomografi (CT) verileriyle fiziksel bir model oluşturulmasını sağlayan yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemde, üretimi istenilen doku veya organa ait üç-boyutlu yapı çeşitli yazılımlar kullanılarak bilgisayar ortamına aktarılır ve organın kesitsel görüntüleri çıkartılır. Doku iskelesi için kullanılacak malzeme, yazılımdan gelen veriler doğrultusunda katmanlar halinde belirlenmiş bir geometriye uygun şekilde oluşturulmaya başlanır. Bu teknikler doku iskelesinin yapısal, tasarımsal ve gözenek yapısının özelliklerinin kontrolü için klasik yöntemlere göre üstündür. Şekil 1.4'te eklemeli üretim yöntemleri verilmiştir.



Şekil 1.4: Eklemeli üretim yöntemleri [23,24].

1.3.1 Stereolitografi

Stereolitografi 1988 yılında 3D systems tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem ışığa duyarlı sıvı polimeri katılaştırmak için UV ışığını kullanır [24]. Şekil 1.5'te stereolitografi yöntemi gösterilmiştir.



Şekil 1.5: Stereolitografi yöntemi [25].

Avantajları

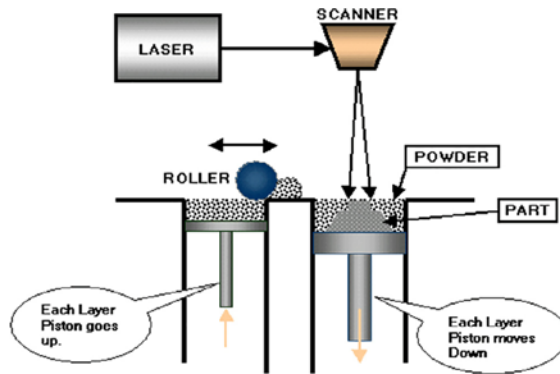
- Yüksek hassasiyet

Dezavantajları

- Sınırlı malzeme seçeneği (Photopolymer olmalı)
- Destek yapısı gereklidir.

1.3.2 Seçici lazer sinterleme

Seçici lazer sinterleme (SLS) yöntemi 1986 yılında DTM tarafından patentlenmiştir. Bu yöntem plastik, metal, seramik ve kompozit toz tabakalarını eritmek için CO₂ lazer kullanan toz esaslı üretim teknolojisidir [24,26]. Hazne ilgili bölgedeki malzemenin erime noktasına kadar ısıtılır ve birbirine kaynaması sağlanır. Geri kalan toz haznedan uzaklaştırılır. Şekil 1.6'da seçici lazer sinterleme yöntemi verilmiştir.



Şekil 1.6: Seçici lazer sinterleme yöntemi [27].

Avantajları

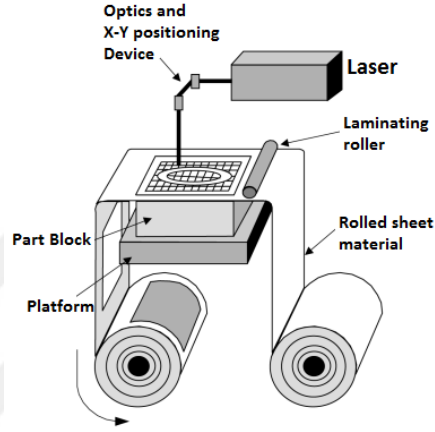
- Yüksek mekanik özellik
- Destek yapısına ihtiyaç duymaz

Dezavantajları

- Yüksek sıcaklığa çıkılması

1.3.3 Laminalı üretim (LOM)

Laminalı üretim 1986 yılında Helisys tarafından patentlenmiştir. Bu teknik, kağıt, plastik veya polimer tabakalarını CO₂ lazer ile katman katman ayırır ve daha sonra 3 boyutlu modeli oluşturmak için basınç veya ısı kullanarak çok katmanlı hale getirir [24-26]. Şekil 1.7’de laminalı üretim yöntemi verilmiştir.



Şekil 1.7: Laminalı üretim yöntemi [28].

Avantajları

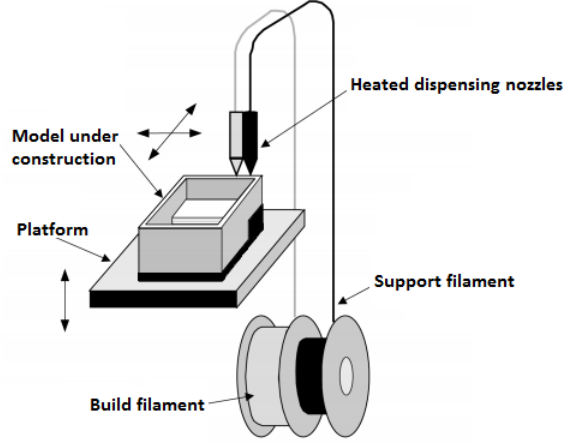
- Düşük maliyet

Dezavantajları

- Atık malzeme

1.3.4 Ergiterek biriktirme yöntemi (FDM)

Ergiterek biriktirme yöntemi (FDM) 1989 yılında ScottCrump tarafından patentlenmiştir. Bu teknoloji malzeme filamentlerini ertir ve daha sonra biriktirerek 3 boyutlu katı modeli oluşturur [28]. Bu yöntem en yaygın kullanılan eklemeli üretim yöntemlerinden biridir. Şekil 1.8’de ergiterek biriktirme yöntemi verilmiştir.



Şekil 1.8: Ergiterek biriktirme yöntemi (FDM) [28].

Avantajları

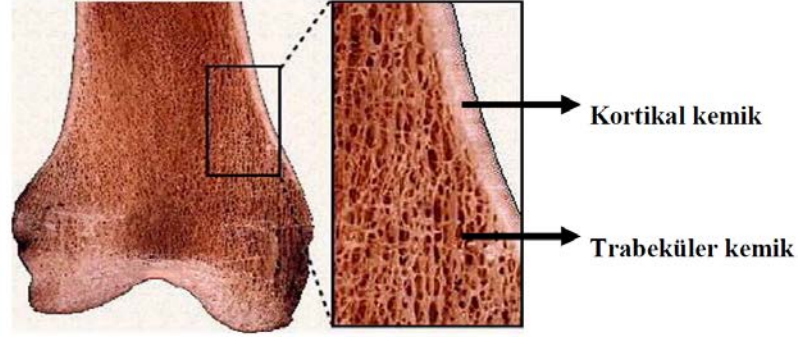
- Düşük maliyet
- Yüksek hassasiyet
- İşlem sonrası kimyasal işlem gerektirmemesi

Dezavantajları

- Yüksek sıcaklığa çıkılması
- Termoplastik polimer kullanılması
- Çıkan ürünün anizotropik özellikte olması

1.4 Kemik Dokusu

Kemik dokusu, organik ve inorganik yapıları içeren kompozit bir yapıdır. İnorganik kısım hidroksiapatit kristalleri halinde bulunan kalsiyum ve fosfat'tan oluşmaktadır. Organik kısım ise yaklaşık olarak %95' lik kısmı kollajenlerden ve geri kalanı ise proteoglikanlar ve proteinlerden oluşmaktadır [29]. Kemik dokusu, morfolojik açıdan sert kemik (Cortical Bone) ve süngerimsi kemik (Cancellous Bone) olmak üzere iki yapıdan oluşmaktadır. Bu yapılar Şekil 1.9'da gösterilmiştir. Sert kemik yapı olarak sert ve yoğun bir yapıdan oluşurken süngerimsi doku ise gözenekli ve gevşek bir yapıdan oluşmaktadır. Ayrıca sert kemik ve süngerimsi kemik arasında işlevsel olarak da farklılık vardır. Sert kemik genellikle mekanik ve koruyucu görevleri üstlenirken, süngerimsi kemik ise daha çok metabolik işlevleri (kalsiyum dengesi gibi) üstlenmektedir.



Şekil 1.9: Sert (Cortical Bone) ve süngerimsi (Cancellous Bone) kemik [30].

Kemik yapısında temelde 3 hücre bulunmaktadır.

- Osteoblastlar
- Osteositler
- Osteoklastlar

Osteoblastlar, kemik yapımını sağlayan, kemik dokunun organik matrisini sentezleyen ve mineralizasyonu düzenleyen hücrelerdir. Temel görevleri matris sentezi ile bölgesel kalsiyum ve fosfor dengesini ayarlamak, ayrıca hidroksiapatit kristallerinin oluşumunu sağlamaktır. Osteositler, osteoblast hücrelerinin olgunlaşması sonucunda oluşan ve kemik dokunun devamlılığını sağlayan hücrelerdir. Diğer kemik hücreleri ile etkileşerek kemik oluşumunu ve iyileşmesini koordine etmektedirler. Osteoklastlar ise kemik matrisini yok ederek kemik dokusunu ortadan kaldıran hücrelerdir. Bu olaya “kemik resorpsiyonu” denir. Osteoklastlar ayrıca, kalsiyumun kemik dokusundan kana salınmasında aktif rol oynayarak, vücut sıvılarında kalsiyum derişiminin homeostatik düzenlenmesinde görev alırlar [31].

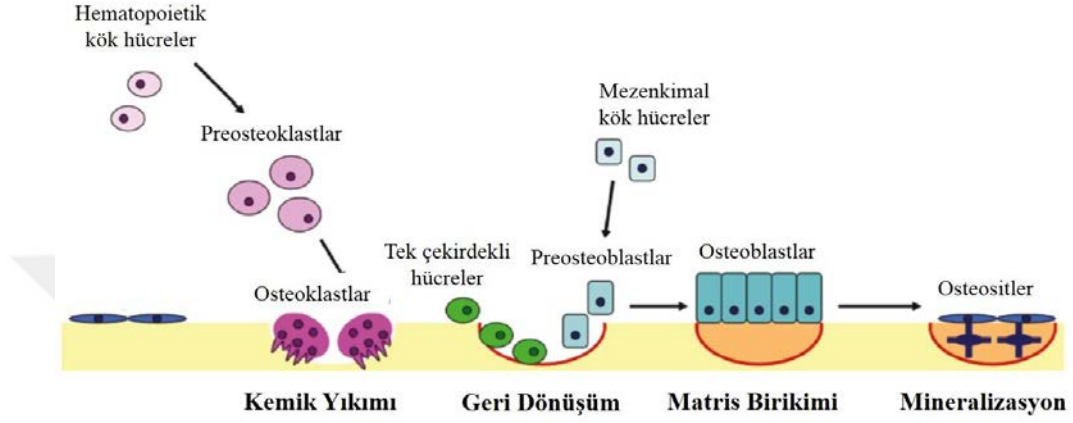
1.4.1 Kemik dokusunun yeniden yapılanması (Bone Remodeling)

Kemik dokusunun yeniden yapılanma süreci temel olarak dört aşamadan meydana gelmektedir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir.

- Kemik Yıkımı
- Geri Dönüşüm
- Matris Birikimi
- Mineralizasyon

Kemiğin yenilenme sürecinde, ilk olarak hasarlı bölgedeki hematoma içerisinde sentezlenen sitokinler osteoklast öncül hücreleri olan preosteoklastların kemik

yüzeyine göç etmesine yardımcı olur ve ardından preosteoklastlar osteoklastlara farklılaşarak kemik yıkımını gerçekleştirir. Sonrasında, osteoblast öncül hücreleri olan preosteoblastlar burada çoğalıp osteoblastlara farklılaşarak kemiğin yıkıma uğrayan bölgesine yerleşirler. Bu bölgede osteoblastlar kemik yapım sürecini uygular ve son olarak osteositlere farklılaşır. Ardından mineralizasyon sonucunda yeni kemik doku oluşur [32]. Şekil 1.10'da kemik dokusunun yeniden yapılanma süreci gösterilmiştir.



Şekil 1.10: Kemik dokusunun yeniden yapılanma süreci [33].

1.5 Literatür Araştırması

Doku mühendisliği ile ilgili çalışmalar özellikle son yıllarda çok büyük bir ivme kazanmıştır ve buna paralel olarak kemik doku iskeleleri üzerine de çalışmalar hızla artmaktadır.

Kemik doku iskelelerinin tasarımında temelde iki yaklaşım görülmektedir. Bunlar tomografi verilerinden elde edilen rastgele gözenekli yapılar ve tekrarlı düzenli periyodik yapılardır. Rastgele gözenekli yapılar, doğal kemiğe benzediği düşünüldüğü için bu alanda sıklıkla başvurulan yapılardır [34]. Ancak bu yapıların mekanik davranış kontrolü sadece gözeneklilik oranı üzerinden yapılabilmektedir ve dolayısıyla sadece eşdeğer elastisite modülü gibi global parametreler karakterize edilebilmektedir. Bununla birlikte, gözeneklerin madde akışına izin verecek şekilde açık olması gerekmektedir. Tekrarlı düzenli yapılar ise üretim yöntemine göre şekillenmektedir. Üretim kolaylığı nedeniyle en sık üretilen yapı wood-pile adı verilen yığılmalı geometridir. Bu geometri kemik doku iskelesi çalışmalarında çok sık görülmektedir [35,36]. Bunun sebebi 2-Boyutlu yama şeklindeki doku iskelelerinde elde edilen birikimin direkt olarak kullanılabilmesidir. Her iki geometrik yaklaşım için

de mekanik davranış modellenmesinde sonlu elemanlar yöntemi yoğun olarak ele alınmıştır [37-42]. Şekil ve topoloji optimizasyon algoritmaları, sonlu elemanlar yaklaşımı ile etkin doku iskelesi tasarımları ortaya koymak için kullanılmıştır [43-46]. Bu optimizasyon çalışmalarında amaç fonksiyonu olarak da mekanik özelliklerin (Eşdeğer Bulk Modülü, Young Modülü vs.) ya da fiziksel özelliklerin (Geçirgenlik, Yayınım) kemik değerleri ile arasındaki farkın minimizasyonu hedeflenmiştir. Ancak kemik doku iskelelerinin özellikleri dinamik biyolojik ve erime süreçlerinden dolayı zamanla değişecektir [47].

Doku iskelesi tasarımında dinamik mekanobiyolojik süreçleri dikkate alarak optimizasyon yapan çalışmalar da mevcuttur [48,49]. Ancak bu çalışmalarda sadece kemik yeniden yapım süreçleri dikkate alınmış, biyobozunma dikkate alınmamıştır. Biyobozunma doku iskelesinin mekanik özelliklerini tamamen etkilemektedir ve özellikle kemik yeniden yapım sürecini etkileyen bir olgudur. Biyobozunma sürecinin uzun sürdüğü uygulamalarda belki ilk aşamada biyobozunma ihmal edilebilir ancak bu yapılar gereğinden fazla yoğun olacağı için oluşan dokular istenilen özellikte olmayacaktır. Gözenek oranı yüksek yapılar ise daha hızlı biyobozunmaya girecektir, dolayısıyla bozunma dikkate alınmadan optimizasyon yapılması doğru değildir. Literatürde biyobozunma etkisini içeren ve mekanobiyolojik yaklaşımla doku iskelesi çalışması yapanlar olmasına rağmen sayı oldukça azdır. Özellikle tekrarlı yükleme durumunun biyobozunmaya etkisinin incelendiği çalışmalar çok sınırlıdır. Adachi ve diğ. (2006) kübik kafes yapılı birim hücre ve küresel boşluklu küp şeklinde birim hücre üzerinde hem biyobozunma hem dinamik kemik oluşum sürecini dikkate alarak optimizasyon çalışması yapmışlar ve biyobozunma sürecindeki elastisite modülü değişikliğini iskele malzemesinin molekül ağırlığına bağlamışlardır. Molekül ağırlığındaki düşüş ise hidrolize bağlanmış ve difüzyon denklemi ile yapıya giren su miktarı belirlenmiştir. Sonuçta su konsantrasyonuna göre değişen bir elastisite modülü elde edilmiştir [8]. Chen ve diğ. (2011a) çalışmalarında kütleli (bulk) şekilde biyobozunan araçlarda biyobozunma ve erozyonu simüle etmek için stokastik hidroliz ve difüzyon esaslı otokatalizi birleştiren hibrit bir matematiksel model önermişlerdir. Bu modelin literatürdeki deneysel çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermişlerdir [50]. Chen ve diğ. (2011b) biyobozunma çerçevesinde yeni doku oluşumunu tetikleyici uyarı miktarını ele alarak farklı doku iskelesi tasarımının performanslarını araştırmışlardır [51]. Jin ve diğ. (2019) kemik doku iskelesinde kullanılmak üzere

farklı gözenek geometrilerine sahip doku iskelelerinin in vitro olarak biyobozunma davranışlarını araştırmışlardır [52]. Li ve diğ. (2017) saf PLA ve Mg/PLA kompozit malzemelerinin in-vitro biyobozunma davranışı üzerine basma yüklemesinin ve sıcaklığının etkilerini araştırmışlardır [53]. Mekanik yükün moleküler aktivasyon enerjisini arttırdığını ve böylece biyobozunma hızının arttığını gözlemlemişlerdir. Li ve ark. (2017) saf PLA ve Mg/PLA kompozit malzemelerinin in-vitro biyobozunma davranışı üzerine dinamik basma yüklemesinin etkilerini araştırmışlardır [54]. Dinamik yükler 0.1 – 0.9 MPa aralığında değişmektedir. Uygulanan yüklerin frekansları ise 0,5- 2,5 Hz aralığındadır. Her iki malzeme içinde dinamik yüklemenin biyobozunmayı hızlandırdığını tespit etmişlerdir. Shi ve diğ. (2018) doku iskelesinde kemik onarımı üzerine günlük egzersiz sürelerinin etkilerini simülasyon yardımıyla hesaplamışlardır [55]. Simülasyon çalışmaları biyobozunma ve kemik yeniden yapılanma teorilerine dayanmaktadır. Doku iskelesi biyobozunmasını mekanik yüklemeden bağımsız stokastik hidroliz denklemiyle tanımlamışlardır. Kemik yapımını ise mekanik yük fonksiyonuna bağlamışlardır. Mekanik yük günün belli bir süresini kapsayacak şekilde trapez şekilde uygulanmıştır. Shui ve diğ. (2019) farklı gözenek geometrisine sahip doku iskelelerinin biyobozunma davranışı üzerine mekanik etkiyi sayısal olarak araştırmak için matematiksel bir model geliştirmişlerdir [56]. Mekanik yüklemdeki artışın doku iskelesinin biyobozunma hızını arttırdığını tespit etmişlerdir. Shi ve diğ. (2020) PLA'dan tasarlanmış doku iskelesinin mekanik yük etkisi altında biyobozunma ve kemik yeniden yapılanma davranışını incelemişlerdir [57]. Biyobozunmayı modellerken stokastik hidroliz denklemlerine mekanik etkiyi de dahil etmişlerdir. Kemik oluşumunu ise sonlu elemanlar algoritmasından elde ettikleri mekanik uyarı fonksiyonu ile tanımlamışlardır. Yükleme belli bir sürede trapez şeklinde uygulanmıştır.

Biyolojik etkilerin incelendiği çalışmalara gelindiğinde, hücre yapışması malzeme yüzeyi ile protein etkileşimi tarafından kontrol edilmektedir. Kemik hücre dışı matrisi ağırlıklı olarak kollajen I ve hidroksiapatitten oluşmaktadır. Gregor ve diğ. (2017) araştırmalarda Kollajen I ve hidroksiapatit bağlanmasını yüzey zeta potansiyel değişimi kullanarak incelendiğini bildirilmiştir [58]. Yüzey zeta potansiyeli her iki durumda da PLA'nın yüzeyine bağlanmayı işaret eden önemli ölçüde değişikliğe uğramıştır. Hücrelerinin ekstrasellüler matrisi (ECM) karmaşık bir dinamiğe sahiptir ve mekanik ve biyokimyasal özelliklere sahip biyoçevreyi oluşturur. Kemikte ECM

hücre yapışmasında, çoğalmasında ve farklılaşmasında rol oynar. Dolayısıyla kemik yapılarında ECM osteoblast hücreleri tarafından yeni kemik üretimini indükleyebilir durumdadır. Genel olarak biyolojik yöne odaklanan çalışmalarda da görülen en büyük eksiklik hücrelerin yüzeyleri sevmesinden dolayı 2-Boyutlu yapılara ya da üçüncü boyutu diğer iki boyutuna göre küçük olan yapılarda çalışılmış olmasıdır.

Yukarıda önemli bir kısmı sunulan çalışmalarda görülen en büyük eksiklik, biyolojik süreçlere odaklanan mikro düzeydeki çalışmaların sadece deneysel ve çok büyük oranda 2-boyutlu olması, mekanik ortama odaklanan makro düzeydeki çalışmaların ise çoğunlukla sadece sayısal modellemeye dayalı olması ve biyobozunma-yük-biyoloji etkileşiminin mekanizmasını tam olarak açıklayamamasıdır. Kemik doku hücrelerin tutunduğu yüzeyin şekline göre adaptasyon geliştirdiği bilinmektedir. Ancak söz konusu mekanik ortam olduğunda, 1850'lerden itibaren Wolff kanunu ile ifadesini bulmasına rağmen hala mekanobiyolojik sürecin temelini anlaşılmasına epey yol vardır. Bu durum, kavram (proof of concept) düzeydeki modellerin uygulamaya dönüşmesine engel olmamalıdır. Öyle ki teorik modellerden cerrahi uygulamaya uzanan süreçte hala çok nokta eksik kalmaktadır. Bunun en önemli sonucu, kemik doku mühendisliğinin cerrahi pratikte henüz hakkettiği karşılığı bulamamış olması ve birçok dezavantajı bulunan greft tedavisine mecbur kalınmasıdır.

Bütüncül bir yaklaşımla hem deneysel hem de nümerik modelleme çalışmalarının birleştirilmesi, teorik modellerin cerrahi uygulamalara dönüşmesini hızlandırabilir. Bu, greft tedavisi gibi mevcut yöntemlerin yerini alabilecek daha etkili çözümler sunabilir ve kemik doku mühendisliğinin cerrahi pratikte hak ettiği yeri bulmasına katkı sağlayabilir.

Bu tez çalışmasında farklı tasarım parametrelerinin (farklı gözenek geometrisi ve oranları) kemik doku iskelesinin kemik rejenerasyonu üzerine etkisi mekanobiyolojik yaklaşımla deneysel olarak detaylıca irdelenmiştir. Deneysel sonuçlardan yararlanılarak da nümerik modellerde kullanılacak uygun katsayılar tespit edilmiştir. Doku iskelelerinin farklı tasarım parametreleri rijitlik, yüzey alanı ve şekil değiştirme enerjisi gibi değişkenleri doğrudan etkilemektedir ve bunlar da doğrudan kemik rejenerasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Özellikle nümerik model sayesinde çok çeşitli doku iskelesi tasarımlarının deneysel çalışma yapmadan kemik rejenerasyonu açısından elverişli olup olmadığı değerlendirilebilecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışmasında kemik doku mühendisliğinde kullanılacak farklı doku iskelesi tasarım parametrelerinin (gözenek geometrisi ve oranı) mekanik dayanım, biyobozunma ve kemik yapılanması üzerine etkileri hem deneysel olarak hem de nümerik olarak araştırılmıştır.

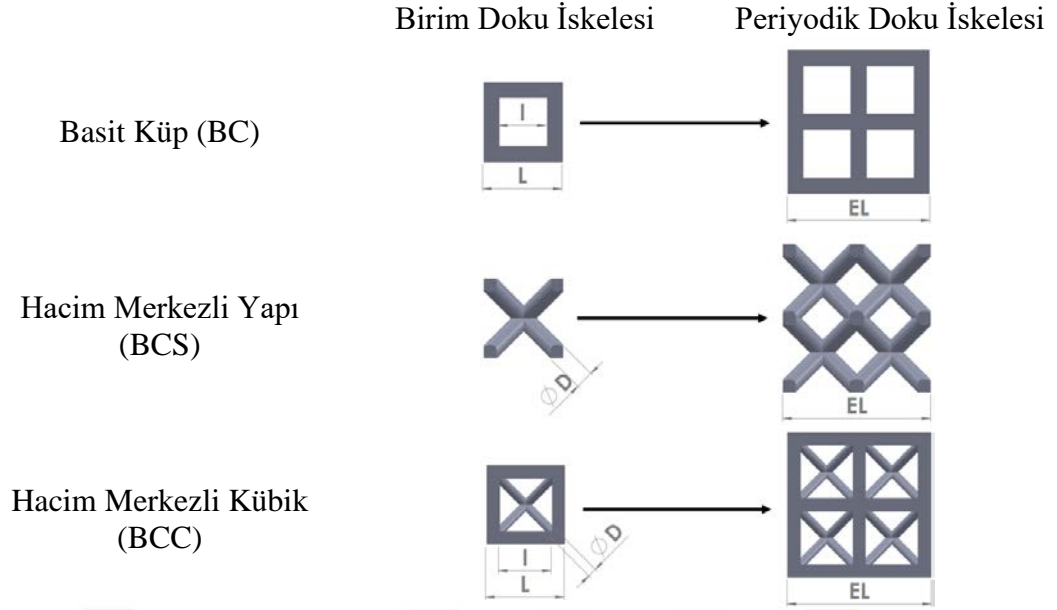
2.1 Çubuk Esaslı Doku İskelesi Tasarımı

Tez çalışmasının bu kısmında biyobozunma ve kemik yeniden yapılanma analizlerinde kullanılacak çubuk esaslı birim doku iskelelerinin tasarımı için Solidworks katı tasarım programından yararlanılmıştır. 3 farklı gözenek geometrisi ve her bir gözenek geometrisi için de 3 farklı gözeneklilik oranı seçilmiştir. Seçilen birim hücre gözenek geometrileri Şekil 2.1' de verilmiştir.



Şekil 2.1: Çubuk esaslı birim doku iskelesi geometrileri.

Basit küp gözenek geometrisine sahip doku iskelesi sadece yatay ve dikey çubuklardan, hacim merkezli yapı gözenek geometrisine sahip doku iskelesi sadece açılı çubuklardan ve hacim merkezli kübik gözenek geometrisine sahip doku iskelesi ise hem yatay ve dikey çubuklardan hem de açılı çubuklardan oluşmaktadır. Çubuk esaslı gözenekli doku iskelelerinin farklı gözeneklilik oranına göre tasarımları çubukların kesit ölçüleri değiştirilerek parametrik olarak yapılmıştır. Bu tasarım parametreler Şekil 2.2' de verilmiştir.



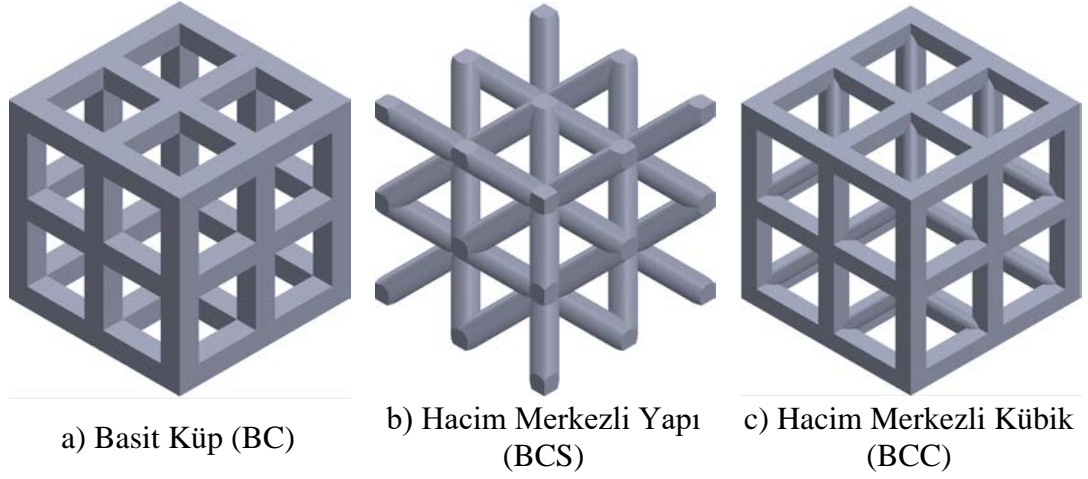
Şekil 2.2: Çubuk esaslı birim doku iskelelerinin tasarım parametreleri.

Tüm geometriler için birim küpün dış kenar uzunluğu 3 mm alınmıştır. Birim hücreler her bir doğrultuda 2' şer kez çoğaltılarak periyodik doku iskelelerinin tasarımları elde edilmiştir. Tasarım parametreleri ve gözeneklilik oranları Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Doku iskelesi tasarım parametreleri.

Doku İskelesi	Bir Doğrultudaki Birim Hücre Sayısı	Doku İskelesi Kenar Uzunluğu (mm)	Birim Hücre Kenar Uzunluğu (L mm)	Gözenek Kenar Uzunluğu (l mm)	Çubuk Çapı (D mm)	Porozite Oranı (%)
BC50	2	5,4	3	1,29	-	50,22
BC62,5	2	5,27	3	1,54	-	62,55
BC75	2	5,145	3	1,80	-	74,08
BCS50	2	5,39	3	-	1,00	51,64
BCS62,5	2	5,47	3	-	0,86	62,50
BCS75	2	5,58	3	-	0,69	74,63
BCC50	2	5,5	3	2	0,88	49,96
BCC62,5	2	5,5	3	2	0,66	62,45
BCC75	2	5,5	3	2	0,35	75,84

Şekil 2.3' te birim hücrelerin her doğrultuda 2'şer kez çoğaltılmasıyla elde edilen periyodik doku iskelelerinin katı modelleri verilmiştir.



Şekil 2.3: Periyodik doku iskelesi katı modelleri.

Çizelge 2.1’de verilen doku iskeleleri isimlerindeki BC basit küp geometrisini, BCS hacim merkezli yapı gözenek geometrisini ve BCC ise hacim merkezli kübik gözenek geometrisini temsil etmektedir. Sondaki sayılar ise gözeneklilik oranını göstermektedir. Çizelge 2.2’de periyodik doku iskelelerinin fiziksel özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.2: Periyodik doku iskelelerinin fiziksel özellikleri.

Doku İskelesi	Yüzey Alanı (mm ²)	Hacim (mm ³)	Spesifik Yüzey Alanı (mm ⁻¹)	Kütle (mg)
BC50	275,023	67,800	4,06	86,925
BC62,5	271,604	54,820	4,95	70,575
BC75	252,720	40,820	6,19	56,125
BCS50	254,724	75,43	3,38	94,600
BCS62,5	250,681	61,380	4,08	79,025
BCS75	233,0965	44,07	5,29	54,475
BCC50	374,5854	83,25	4,50	105,800
BCC62,5	369,320	62,470	5,91	75,900
BCC75	326,3192	40,2	8,12	55,275

2.2 Doku İskelesi Geometrilerinin 3 Boyutlu Yazıcıda Üretilmesi

Çizelge 2.1’deki tasarım parametreleri kullanılarak tasarımı gerçekleştirilen periyodik doku iskelesi geometrilerinin üretimi Ultimaker 3 Extended marka 3 boyutlu yazıcıyla gerçekleştirilmiştir. Periyodik doku iskelelerinin üretiminde Ultimaker marka 2,85 mm filament çapına sahip transparan PLA filamentler kullanılmıştır. Periyodik doku iskelelerinin basım parametreleri Cura isimli yazılım kullanılarak ayarlanmıştır. Üretimi gerçekleştirilecek periyodik doku iskelesi geometrileri stl formatında Cura yazılımında açıldıktan sonra basım parametreleri seçilmiştir. Kullanılan basım parametreleri aşağıda verilmiştir.

- Nozzle Çapı: 0,25 mm
- Nozzle Sıcaklığı: 190 °C
- Tabla Sıcaklığı: 60 °C
- İlerleme Hızı: 15 mm/s
- Fiber Geri Çekme Hızı: 6,5 mm/s

Yukarıda verilen basım parametreleri Cura’da seçildikten sonra dilimleme işlemine geçilmiştir. Dilimleme işlemi tamamlandıktan sonra basım dosyası g kodu formatında usb belleğe kaydedilmiştir. Bu usb bellek üzerinden de 3 boyutlu yazıcıda basım işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.3 Üretilmiş Doku İskelelerinin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)

Görüntüleri

3 boyutlu yazıcı ile PLA filamentten üretilen doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri Bursa Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan Zeiss Gemini 300 ile kaydedilmiştir. Görüntüleme öncesi doku iskelelerinin elektriksel iletkenliğini sağlamak için altın ile kaplama işlemi yapılmıştır. Doku iskelelerinin gözenek detaylarını görüntülemek için 30X büyütme kullanılmıştır.

2.4 Mekanik Karakterizasyon

Tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskeleleri nümerik simülasyonlarda, biyobozunma ve in vitro deneylerde bası yükü altında analiz

edilecektir. Bundan dolayı üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskelelerinin mekanik özelliklerini belirlemek için basma testleri gerçekleştirilmiştir.

2.4.1 Doku iskelelerinin basma testi

3 boyutlu yazıcıda üretilen farklı geometri ve porozite oranlarına sahip olan periyodik doku iskelelerinin bası yükü altındaki davranışını karakterize etmek için 1 kN kapasiteye sahip Shimadzu AGS-X statik test cihazı kullanılmıştır. Şekil 2.4'te periyodik doku iskelesinin basma testi görseli verilmiştir.

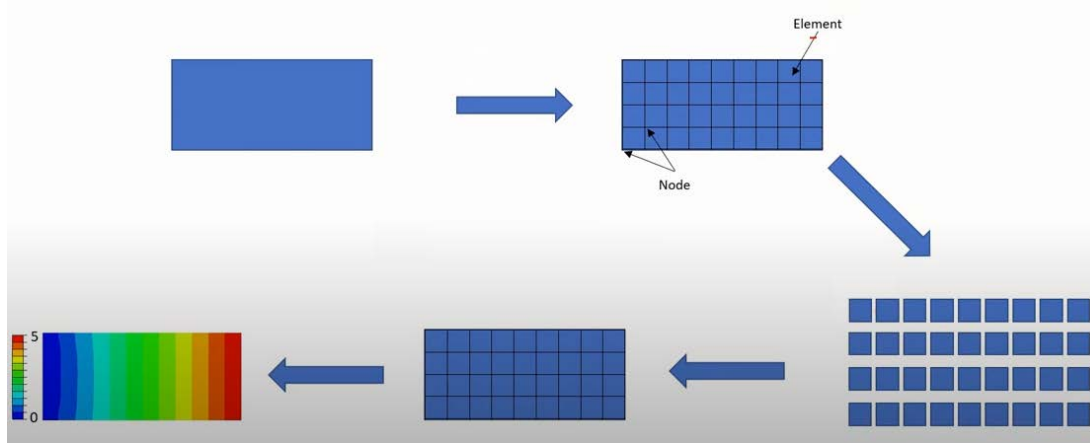


Şekil 2.4: Periyodik doku iskelesinin basma testi.

Periyodik doku iskelelerinin basma testleri 0,3 mm/dk basma hızında gerçekleştirilmiş olup yük-yer değiştirme verileri kaydedilmiştir.

2.5 Sonlu Elemanlar Yöntemi

Sonlu elemanlar yöntemi (FEM) birçok mühendislik probleminin çözümünde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sonlu elemanlar yönteminde (FEM) ele alınan problem alanı eleman adı verilen daha küçük elemanlara bölünür. Her bir eleman ise düğüm noktalarından (node) oluşmaktadır. Her bir eleman için ayrı ayrı rijitlik matrisleri hesaplandıktan sonra montajlama işlemi yapılarak global rijitlik matrisi oluşturulur. Elde edilen global rijitlik matrisi kullanılarak verilen sınır şartları altında çözüm işlemi yapılarak şekil değiştirme, gerilme gibi değerler hesaplanabilmektedir. Bu işlemler Şekil 2.5'te görülmektedir.

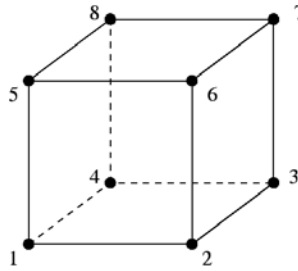


Şekil 2.5: Sonlu elemanlar yöntemi (FEM) [59].

Elde edilen gerilme ve birim şekil değiştirme değerleri biyobozunma ve kemik yeniden yapılanma analizlerinde kullanılacaktır. Mekanik yük etkisi altında periyodik doku iskelelerinin gerilme ve birim şekil değiştirme değerlerini eleman eleman hesaplamak için MATLAB ortamında 3 boyutlu sonlu elemanlar algoritması geliştirilmiştir. 3 boyutlu sonlu elemanlar algoritmasında kullanılan sonlu elemanlar teorisi EK A’da ve MATLAB ortamında kodlanması EK B’de verilmiştir.

2.5.1 Voxel tip mesh yapısı

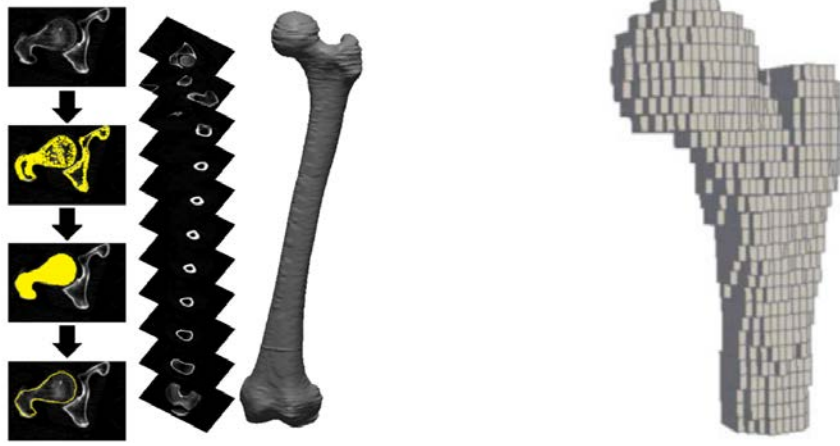
Sonlu elemanlar analizinde mesh tipi olarak hexahedron mesh tercih edilmiştir. Bu mesh tipi 8 adet düğüm noktasına sahiptir Şekil 2.6’da gösterilmiştir [60].



Şekil 2.6: 3 boyutlu 8 düğüm noktalı hexahedron eleman [61].

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında mikro-BT taramaları yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve tarama kesitlerindeki piksellere göre sonlu elemanlar analizinde kullanılacak meshler oluşturulmaktadır. Bu yönteme voxel mesh yöntemi adı verilmektedir ve voxel bir pikselin 3 boyutlu karşılığıdır. Voxel yönteminde eşit boyutlu küp elemanlar geometriyi temsil etmektedir. Küp elemanların kenar uzunluğu ne kadar küçük olursa geometriyi temsiliyeti o kadar iyi olacaktır fakat eleman sayısı da yüksek olacağı için hesaplama sürelerini çok arttıracaktır. Bunun için ideal boyut

seçilmesi önemlidir. Şekil 2.7’de uyluk kemiğinin bilgisayarlı tomografi (CT) görüntülerinden voxel tipi meshlerin oluşturulması gösterilmiştir.

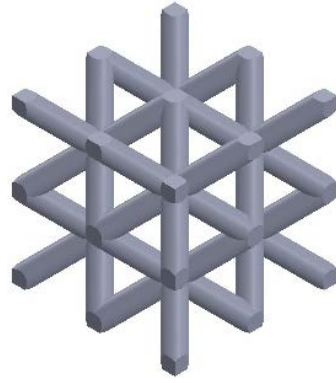


Şekil 2.7: Uyluk kemiğinin bilgisayarlı tomografi (BT) görüntülerinden voxel mesh oluşturulması [62].

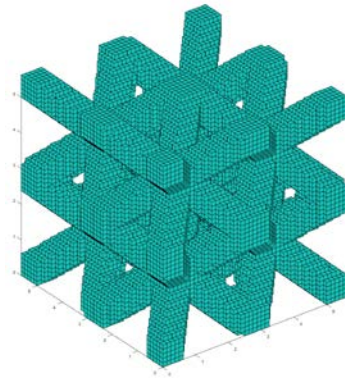
Tez kapsamında yapılan tüm sonlu elemanlar analizlerinde mesh boyutu 125 μm olarak seçilmiştir. Ayrıca klasik mesh yöntemleriyle karmaşık geometrilere ve özellikle eğrisel veya açısız yüzeylere sahip geometrilere hexahedron tipi mesh atılamaz. Bundan dolayı doku iskelelerine mesh atmak için şu yol izlenmiştir.

- Öncelikle periyodik doku iskelesi geometrisi katı tasarım programında tasarlandıktan sonra stl formatında kaydedilmiştir.
- Stl formatında kaydedilen doku iskelesi geometrisini voxel geometrisine çevirmek için online olarak çalışan bir program (Online Voxelize) içerisinde açılmıştır. Bu programda periyodik doku iskelesi geometrisinin bir kenarının kaç adet voxel küpten oluşması isteniliyorsa bunun sayısını girerek geometri voxel geometriye dönüştürülmüştür. Dönüştürülen geometri tekrar stl dosya formatında kaydedilmiştir.
- Stl formatındaki voxel geometri tekrar katı tasarım programında açılarak katı hale çevrilir ve daha sonra elemanlar birleştirilerek step formatında kaydedilir.

Step formatındaki dosya sonlu elemanlar yazılımında açılarak ilgili dilimleme işlemleri yapılarak daha önce hexahedron tipi elemanlarla meshlenemeyen geometri rahatlıkla hexahedron elemanlarla meshlenebilmektedir.



BCS75 Katı Model



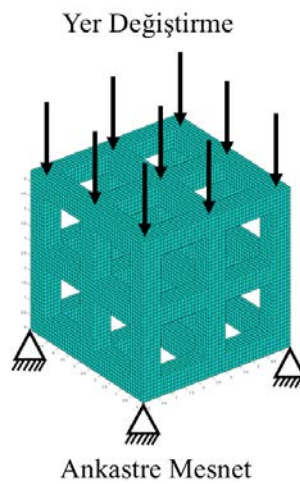
BCS75 Mesh

Şekil 2.8: BCS75 periyodik doku iskelesinin katı model ve mesh görüntüleri.

Şekil 2.8’de BCS75 periyodik doku iskelesinin katı model ve mesh görüntüleri verilmiştir. Özellikle BCS ve BCC doku iskelelerine açılı ve dairesel kesitli çubuklardan oluştuğu için katı model haline hexahedron elemanlar kullanarak mesh atmak mümkün değildir. Ancak katı model yukarıda anlatıldığı gibi voxel geometriye dönüştürüldüğü zaman Şekil 2.8’de gösterildiği gibi hexahedron elemanlar ile mesh işlemi gerçekleştirilebilmiştir.

2.5.2 Basma testinin sonlu elemanlar analizi

MATLAB programı üzerinde geliştirilen 3 boyutlu sonlu elemanlar algoritması kullanılarak tasarımı gerçekleştirilen periyodik doku iskelelerinin basma simülasyonları yapılmıştır. Sonlu elemanlar analizinde lineer-elastik malzeme kabulü yapılmıştır. Sonlu elemanlar analizinde kullanılan sınır şartları Şekil 2.9’da verilmiştir.



Şekil 2.9: Sonlu elemanlar analizindeki sınır şartları.

Sınır şartları periyodik doku iskelesi geometrisinin en alt kısmındaki düğüm noktalarının serbestlik dereceleri 3 ekseninde de kısıtlanarak ve yük ise doku iskelesinin

en üst kısmında bulunan düğüm noktaları üzerinden yer değiştirme olarak tanımlanmıştır. Yer değiştirmeye karşılık oluşan reaksiyon kuvvetleri mesnet noktasından hesaplanarak yük-yer değiştirme değerleri sonlu elemanlar analizinden elde edilmiştir. Elde edilen yük-yer değiştirme değerlerinden periyodik doku iskelelerinin rijitlik değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca bu sonuçlar basma deneylerinden elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır.

2.6 Periyodik Doku İskelelerinin Biyobozunma Davranışları

Periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışları karakterize edebilmek için hem nümerik modeller hem de deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında nümerik olarak iki farklı biyobozunma modeli yaklaşımı kullanılmıştır. Nümerik modellerden ilki biyobozunma sürecini birinci dereceden kinetik (First-Order Kinetics) model kullanarak ele almıştır. Bu model, doku iskelesi malzemesinin moleküler ağırlığının zamanla üstel bir şekilde azaldığını varsayarak biyobozunma davranışını matematiksel olarak ifade etmektedir. Ayrıca bu model ile mekanik yüklerin biyobozunma davranışı üzerine etkileri de incelenebilmektedir. Diğer nümerik model ise difüzyon esaslı biyobozunma yaklaşımıdır. Bu yaklaşım, doku iskelesi malzemesine sıvının difüzyonunu ve moleküler ağırlığı üzerine etkilerini temel alır. Son olarak doku iskelelerinin biyobozunma davranışı mekanik yük etkisi altında deneysel olarak da incelenmiştir.

2.6.1 Biyobozunma davranışının birinci dereceden kinetik modeli

Periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışını analiz edebilmek için Shui ve diğ. (2019) yılında yapmış oldukları birinci dereceden kinetik biyobozunma modeli kullanılmıştır [56]. Bu modele göre polimer malzemesinin moleküler ağırlık değişimi Denklem 2.1 ile tanımlanmaktadır.

$$\beta(t) = \frac{M_n(t)}{M_n(0)} = e^{-\lambda_0 t} \quad (2.1)$$

$\beta(t)$ normalize edilmiş molekül ağırlığını temsil etmektedir. Burada $M_n(0)$ başlangıç molekül ağırlığı ve $M_n(t)$ ise t anındaki molekül ağırlığıdır. İdeal olarak polimerin izotropik olduğu ve tüm malzeme noktalarının aynı $M_n(0)$ başlangıç molekül ağırlığına sahip olduğu düşünülmektedir. Fakat doku iskelesi elemanları çevresel nemden dolayı hidroliz tarafından sebep olunan farklı başlangıç porozitelerine (α) sahiptir. Shui ve

diğ. (2019) çalışmalarında bu değeri 0 ve 0,2 arasında rastgele bir değer seçerek bozunma sürecini ayarlamaya çalışmışlardır. Tez kapsamında doku iskelesinin tüm elemanları için ideal olarak başlangıç molekül ağırlığına sahip olduğu kabulü yapılmıştır. λ_0 ise biyobozunma katsayısıdır.

Shui ve diğ. (2019) çalışmalarında mekanik yükün λ_0 biyobozunma katsayısı üzerinde etkisini Denklem 2.2 ile ifade etmişlerdir. Mekanik yük etkisi polimer zincirlerinin kırılmasındaki aktivasyon enerjisini düşürerek daha hızlı bozunmasını sağlamaktadır.

$$\lambda_\sigma = \lambda_0 e^{\frac{B\sigma}{RT}} \quad (2.2)$$

Burada B katsayı, R molar gaz sabiti, T sıcaklık (K), σ uygulanan mekanik gerilmedir. Denklem 2.2’de elde edilen λ_σ biyobozunma katsayısı Denklem 2.1’de yerine konulursa

$$\beta(t) = e^{-\lambda_\sigma t} = e^{-\lambda_0 e^{\frac{B\sigma}{RT}} t} \quad (2.3)$$

elde edilir. Denklem 2.3 ile polimerin biyobozunma sürecine uygulanan mekanik yükleme de dahil edilmiştir.

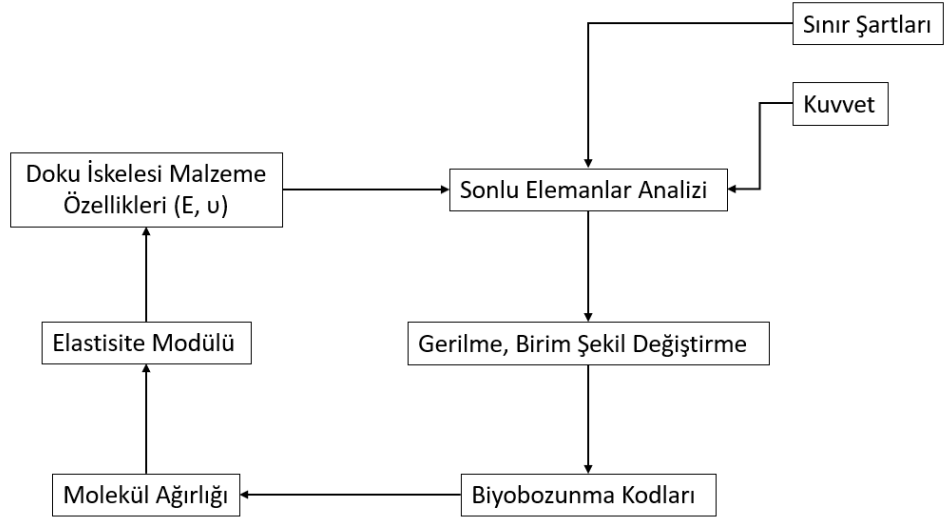
Denklem 2.3’teki $\beta(t)$ değeri kritik eşik değerinin altına düşerse polimerin bozunduğu kabul edilir. Kullanılan bu modelde polimerin mekanik özelliği molekül ağırlığıyla doğrudan ilişkilidir ve bu ilişki Denklem 2.4’te verilmiştir.

$$E_s(t) = (E_s(0) - E_{solu}) \frac{e}{e-1} (1 - e^{-\beta(t)}) + E_{solu} \quad (2.4)$$

$E_s(0)$ polimerin başlangıç elastisite modülüdür. E_{solu} ise polimerin biyobozunma esnasında içinde bulunduğu sıvının elastisite modülüdür.

2.6.1.1 Birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinin sonlu elemanlar analizi algoritmasına entegre edilmesi

Mekanik yük etkisi altında doku iskelesinin biyobozunma davranışını analiz edebilmek için geliştirilmiş olan 3 boyutlu sonlu elemanlar koduna Bölüm 2.5.1’de verilen biyobozunma davranışı entegre edilmiştir. Şekil 2.10’da biyobozunma modelinin sonlu elemanlar koduyla birlikte çalışma algoritması verilmiştir.



Şekil 2.10: Birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinin sonlu elemanlar kodlarıyla çalışma algoritması.

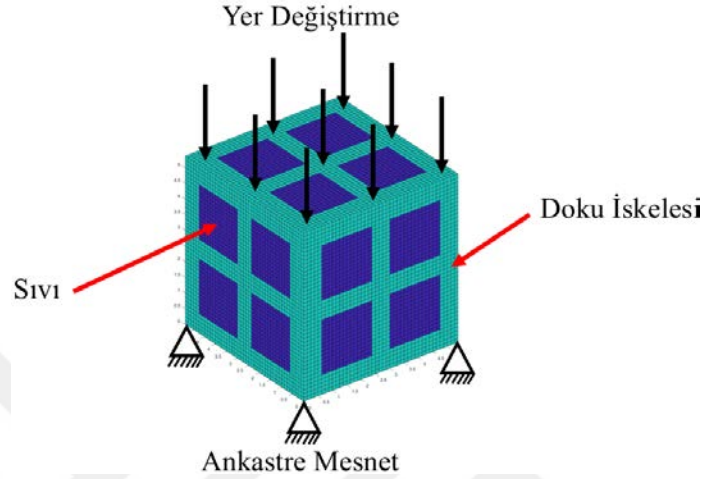
Bu algorithmada, analiz öncesinde sınır şartları (kuvvet ve mesnet), malzeme özellikleri (elastisite modülü ve poisson oranı) ve biyobozunma modelinde kullanılan parametreler tanımlanmalıdır.

Simülasyon Şekil 2.10’da verilen algorithmaya göre sonlu elemanlar analiziyle başlamaktadır. Sonlu elemanlar analizinden doku iskelesinin her elemanı için gerilme ve birim şekil değiştirme değerleri çıktı olarak alınmaktadır. Elde edilen bu değerler biyobozunma kodlarının girdisidir. Biyobozunma kodlarında Denklem 2.3 ve 2.4 kullanılarak doku iskelesinin her bir elemanı için yeni molekül ağırlığı ve elastisite modülü değerleri hesaplanarak bir sonraki döngü için algorithmanın malzeme özellikleri tablosuna kaydedilmektedir. Doku iskelesinin malzemesinin molekül ağırlığı belirli bir eşik değerinin altına düşerse bu elemanın bozunduğu kabul edilmektedir ve sıvıya dönüştürülmektedir. Çizelge 2.2’de nümerik modelde kullanılan katsayılar verilmiştir.

Çizelge 2.3: Birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinde kullanılan katsayılar [63].

Parametreler	Sembol	Değer	Birim
Bozunma Sabiti	λ_0	0,0075	gün ⁻¹
Eşik Değer	β_{th}	0,01	
Sabit	B	22	J/(mol.Pa)
Gaz Sabiti	R	8,314	J/(mol.K)
Sıcaklık	T	310	K
Doku İskelesi Elastisite Modülü	E_s	1350	MPa
PBS Sıvısı Elastisite Modülü	E_{solu}	1	MPa
Doku İskelesi Poisson Oranı	ν_s	0,3	
PBS Sıvısı Poisson Oranı	ν_f	0,49	

Sonlu elemanlar analizinde mekanik yük değeri olarak 4N seçilmiştir. Uygulanan 4 N'luk yük değeri tasarımı gerçekleştiren tüm periyodik doku iskeleleri üzerinde ortalama olarak 1-2 MPa'lık gerilme değeri oluşturmaktadır. Bu gerilme değeri doku iskelesi uygulamalarında arzu edilen bir değerdir. Şekil 2.11'de biyobozunma analizlerinde kullanılan sonlu elemanlar analizi sınır şartları gösterilmiştir.



Şekil 2.11: Biyobozunma analizindeki sonlu elemanlar analizi sınır şartları.

Şekil 2.11'de görüldüğü üzere doku iskeleleri sıvı ile sonlu elemanlar analizinde modellenmiş olup malzeme özellikleri Çizelge 2.2'deki gibi tanımlanmıştır. Doku iskelesinin en alt kısmındaki düğüm noktalarının yer değiştirmeleri 3 ekseninde de kısıtlanmıştır. Yük ise doku iskelesinin en üst kısmındaki düğüm noktalarından sadece düşey doğrultuda olacak şekilde yer değiştirme olarak verilmiştir. Burada yer değiştirme değerleri 4 N'luk yük oluşturacak şekilde her çevrimde otomatik olarak hesaplanarak uygulanmıştır.

2.6.2 Difüzyon esaslı biyobozunma modeli

Difüzyon esaslı biyobozunma modeli sıvının doku iskelesi malzemesi içerisine difüzyonla girmesini ve polimer malzemesinin moleküler ağırlığı üzerine etkilerini esas almaktadır. Adachi ve diğ. (2006) yapmış oldukları çalışmaya göre polimerin içerisine difüzyonla giren su polimerin zincirlerinin kesilmesine ve bundan dolayı molekül ağırlığının azalmasına sebep olmaktadır [8]. Molekül ağırlığı azalan polimerin de mekanik özellikleri (Elastisite Modülü) zayıflayacaktır. PLA gibi polimerlerde moleküler ağırlık belli bir eşik değerine geldiği zaman tamamen bozunma gözlemlenecektir. Bu tarz bozunmaya kütleli (bulk) bozunma ismi verilmektedir. Şekil 2.12'de kütleli (bulk) bozunmanın aşaması verilmiştir.



Şekil 2.12: PLA Polimerinin kütleli (bulk) bozunması [64].

Adachi ve ark. polimer malzemenin elastisite modülünün molekül ağırlığıyla ilişkisini Denklem 2.5'teki gibi ifade etmişlerdir.

$$E_s(W(t)) = E_{s0} \frac{W(t)}{W_0} \quad (2.5)$$

Burada E_0 başlangıç elastisite modülüdür. W_0 başlangıç molekül ağırlığıdır. Difüzyondan dolayı molekül ağırlığındaki değişim $W(t)$ ile ifade edilmektedir.

$$\frac{dW(t)}{dt} = -\beta c \text{ ve } \frac{dc}{dt} = \alpha \nabla^2 c \quad (2.6)$$

Denklem 2.6 sayesinde difüzyona bağlı olarak molekül ağırlığı değişimi hesaplanabilmektedir. Burada β malzeme katsayısı ve c su miktarını temsil etmektedir. Zamana göre su miktarını veren denklem iki yolla çözülebilir. Bunlardan ilki analitik çözüm diğeri sayısal çözüm yöntemidir. Analitik olarak denklemi 3 boyutlu olarak çözmek ve sınır şartlarını uygulamak oldukça zor olacağı için kodlama kısmında sayısal çözüm yöntemleri kullanılmıştır.

2.6.2.1 Difüzyon denkleminin sayısal yöntemlerle çözülmesi

Difüzyon denklemi parabolik tipte kısmi diferansiyel denklemdir. Parabolik denklemler verilen başlangıç ve sınır şartlarından başlayarak, bir yöne doğru adım adım ilerleyerek çözülür. Yani, bir noktadaki çözüm o noktadan önceki noktaların çözümüne bağlı olarak elde edilir. Bu çözümleri yapabilmek için sonlu fark yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntem çözüm alanının grid (ağ) noktalarına ayırarak verilen diferansiyel denklemin bu noktalardaki fonksiyonun değerlerine bağlı olan cebirsel denklemlere dayanır. Sonlu farklar yöntemiyle difüzyon denkleminin çözümünde çözüm alanı gridlere bölüldükten sonra verilen difüzyon denklemindeki türev ifadeleri yerine sonlu farklar ifadesi yerleştirilerek sonlu farklar denklemine dönüştürülür. Denklem 2.7 3 boyutlu difüzyon denklemini ifade etmektedir.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \alpha \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad (2.7)$$

$$t = 0 \quad \text{için} \quad c = C_0 \quad (a \leq x \leq b, \quad c \leq y \leq d, \quad e \leq z \leq f) \quad (2.8)$$

$$x = a \quad \text{için} \quad c = C_a$$

$$x = b \quad \text{için} \quad c = C_b$$

$$y = c \quad \text{için} \quad c = C_c$$

$$y = d \quad \text{için} \quad c = C_d$$

$$z = e \quad \text{için} \quad c = C_e$$

$$z = f \quad \text{için} \quad c = C_f$$

(2.9)

Denklem 2.8 ve 2.9 3 boyutlu difüzyon denkleminin başlangıç ve sınır şartlarıdır. Denklem 2.7'de verilen difüzyon denkleminin sonlu farklar ifadesini yazmak için zaman türevini ileri sonlu fark, x , y ve z konum türevlerini n 'inci adım merkezi farklarda yazarak elde edebiliriz.

$$\begin{aligned} \frac{C_{i,j,k}^{n+1} - C_{i,j,k}^n}{\Delta t} = \alpha & \left[\frac{C_{i-1,j,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i+1,j,k}^n}{\Delta x^2} \right. \\ & + \frac{C_{i,j-1,k}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j+1,k}^n}{\Delta y^2} \\ & \left. + \frac{C_{i,j,k-1}^n - 2C_{i,j,k}^n + C_{i,j,k+1}^n}{\Delta z^2} \right] \end{aligned} \quad (2.10)$$

Denklem 2.10 Denklem 2.7'de verilen 3 boyutlu difüzyon denkleminin sonlu farklar ifadesidir. Verilen başlangıç ve sınır şartları altında bu denklem adım adım kolaylıkla çözülebilir. Periyodik doku iskelelerinin başlangıç ve sınır şartlarının nasıl tanımlandığı EK C'de verilmiştir. Denklem 2.10'daki sonlu farklar denkleminde hesaplanan konsantrasyon değeri Denklem 2.6'da yerine koyularak polimerin moleküler ağırlığı hesaplanmıştır. Hesaplanan moleküler ağırlık Denklem 2.5'te kullanılarak polimerin elastisite modülü hesaplanmıştır. Çizelge 2.3'te difüzyon esaslı biyobozunma modelinde kullanılan katsayılar verilmiştir.

Çizelge 2.4: Difüzyon esaslı biyobozunma modelinde kullanılan katsayılar.

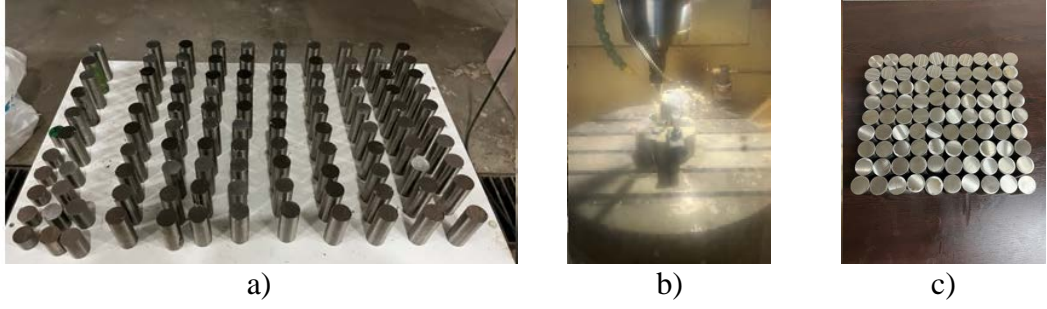
Katsayılar	Sembol	Değer	Birim	
PLA Başlangıç Elastisite Modülü	E_{s0}	1350	MPa	Şenaysoy ve Lekesiz (2024)
PLA Poisson Oranı	ν_s	0,3	-	
Malzeme Katsayısı	β	4000	1/(gün)	Adachi ve diğ. (2006)
Difüzyon Katsayısı	α	4e-7 4e-8	$mm^2/gün$	
Başlangıç Moleküler Ağırlık	W_0	70000	-	
Moleküler Ağırlığın Sınır Değeri	W_{th}	10000	-	

2.6.3 Mekanik yük etkisi altında biyobozunma deneyleri

Periyodik doku iskelelerinin mekanik yük etkisi altında biyobozunma davranışı deneysel olarak 15, 30, 60, 90 ve 120 gün boyunca 37 ± 1 °C ortam sıcaklığında incelenmiştir. Mekanik yükün biyobozunma davranışı üzerine etkisini değerlendirmek için aynı şartlar altında mekanik yük uygulanmadan da periyodik doku iskelelerinin biyobozunma deneyleri gerçekleştirilmiştir. Mekanik yükün uygulanmadığı gruplar kontrol grubu olarak kabul edilmiştir.

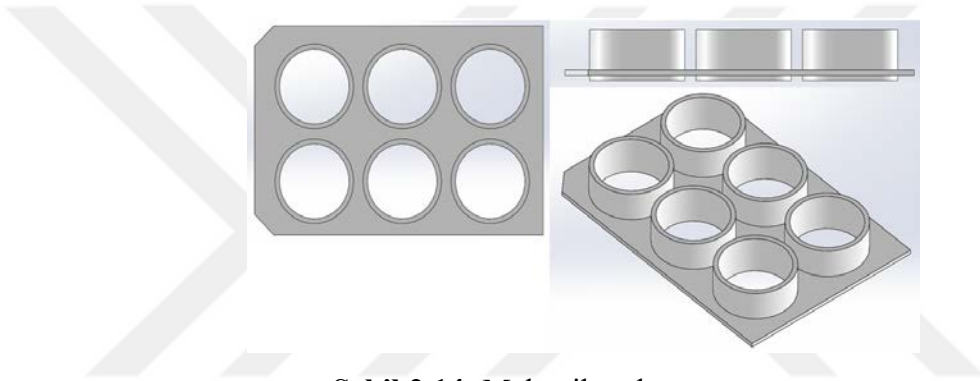
2.6.3.1 Biyobozunma deneylerinde kullanılan mekanik yüklerin üretimi

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında doku iskeleleri üzerinde arzu edilen gerilme değerleri 1-2 MPa aralığındadır. Bundan dolayı biyobozunma deneylerinde kullanılacak yük değeri periyodik doku iskelelerinin sonlu elemanlar analizinden elde edilen Von Mises gerilme dağılımına göre 4 N olarak seçilmiştir. 4 N'luk mekanik yükü uygulamak için 30 mm çapında 73,8 mm yüksekliğe sahip 316 paslanmaz çelik kullanılmıştır. Mekanik yükleri hazırlamak için 30 mm çapında yaklaşık 77 mm uzunluğunda 316 paslanmaz çelik malzemeler Şekil 2.13a'da görüldüğü gibi alınmıştır. 4 N'luk yükü sağlamak için malzemenin yaklaşık olarak 408 g ağırlığa getirilmesi gereklidir. Bunun için Şekil 2.13b'de görüldüğü gibi 5 eksenli CNC freze kullanılarak 316 paslanmaz çelik silindir parçalar 408 ± 1 g ağırlığa sahip olacak şekilde işlenmiştir. İşlenen parçaların son hali Şekil 2.13c'de verilmiştir.



Şekil 2.13: 316 paslanmaz çelik ağırlıklar.

4 N'luk mekanik yük etkisi altında periyodik doku iskelelerinin biyobozunma deneyleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarının içerisinde yapılmıştır ve mekanik yükün periyodik doku iskelelerine tam dik olacak şekilde uygulanması için Şekil 2.14'te gösterildiği gibi bir aparat tasarımı yapılmıştır.



Şekil 2.14: Mekanik yük tutma aparatı.

Tasarımı gerçekleştirilen aparat 3 boyutlu yazıcıda PLA filament kullanılarak üretilmiştir. Şekil 2.15'te üretimi gerçekleştirilen aparat periyodik doku iskeleleri üzerinde 316 paslanmaz çelik ağırlıkları dik bir şekilde tutmaktadır.



Şekil 2.15: 4 N'luk mekanik yüklerin periyodik doku iskelelerine uygulanması.

2.6.3.2 Biyobozunma deneyleri

Biyobozunma deneyleri ASTM F1635-11 standardı takip edilerek yapılmıştır. Biyobozunma deneyleri periyodik doku iskeleleri için yüksüz (kontrol grubu) ve yüklü

gruplardan oluşmaktadır ve her grup ta 10'ar adet periyodik doku iskelesi numunesinden oluşmaktadır. Bu 10'lu numune gruplarından 4'er tanesi ağırlık kaybı ölçümünde, kalan numuneler ise mekanik test için kullanılmıştır. Çizelge 2.5'te biyobozunma deneylerinde kullanılan periyodik doku iskelesi numune sayıları verilmiştir.

Çizelge 2.5: Biyobozunma deneylerinde kullanılan periyodik doku iskelesi numune sayıları.

Günler	Periyodik Doku İskeleleri									Toplam
	BC50	BC62,5	BC75	BCS50	BCS62,5	BCS75	BCC50	BCC62,5	BCC75	
15	20	20	20	20	20	20	20	20	20	180
30	20	20	20	20	20	10	20	20	20	170
60	20	20	20	20	20	10	20	20	20	170
90	20	20	20	20	10	10	20	20	20	160
120	20	20	20	20	10	10	20	20	20	160
Toplam	100	100	100	100	80	60	100	100	100	840

Biyobozunma deneylerine başlamadan önce üretilen periyodik doku iskelesi numuneleri 48 saat boyunca 37 °C sıcaklıkta tutularak içerisindeki olası nem kurutulmuştur.



a) BC

b) BCS

c) BCC

Şekil 2.16: Periyodik doku iskelelerinin kurutma öncesi.

Şekil 2.16'da periyodik doku iskelelerinin inkübatörde kurutma işlemine başlamadan önceki fotoğrafları verilmiştir. 48 saat boyunca 37 °C sıcaklıkta bekledikten sonra her bir tasarım parametresi için ilk 4 numunesinin ağırlıkları hassas tartıda ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra geometri ve porozite durumuna göre değişen her koşul için 10 farklı numune kontrol grubu için, 10 farklı numune Şekil 2.17'de de görüldüğü gibi 4 N'luk mekanik yüke maruz kalacak şekilde 37 °C sıcaklıkta fosfat tamponlu salin (PBS) (pH ~7,4) çözeltisi içerisinde biyobozunmaya bırakılmıştır.



Şekil 2.17: Biyobozunma deneyleri.

Hem kontrol grubu hem de yüklü durumdaki deneylerde 6 ml PBS sıvısı kullanılmıştır. Biyobozunma ortam sıvısı olarak kullanılan PBS çözeltisinin içeriğinde sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4) ve potasyum fosfat mono bazik (KH_2PO_4) gibi farklı reaktif maddeler bulunmaktadır. PBS çözeltisinin hazırlanması için öncelikle 800 ml distile su içerisinde 8 g NaCl (AFG Bioscience), 0,2 g KCl (AFG Bioscience), 1,44 g Na_2HPO_4 (AFG Bioscience) ve 0,245 g KH_2PO_4 (AFG Bioscience) çözdürülmüştür. Reaktif maddeler tamamen çözüldükten sonra sıvının pH değerini ayarlamak için seyreltilmiş hidroklorik asit (HCl) az miktarlarda eklenmiştir. Ardından toplam hacim 1 L olacak şekilde hazırlanan sıvı üzerine 200 ml distile su dahil edilerek biyobozunma ortam sıvısı biyobozunma deneyleri için hazır hale getirilmiştir. Biyobozunma deneyi süresi boyunca 5 günde bir pH ölçümü ve PBS sıvısı değişimi yapılmıştır. Kontrol grubu numunelerinin biyobozunma deneyleri 15 ml' lik kapaklı falkon tüplerinin içerisinde yapılmıştır. Falkon tüplerinin ağzı kapalı olduğu için PBS sıvısında bir eksilme görülmemiştir. Fakat yüklü durumdaki numuneler 6 kuyucuklu hücre kültürü kapları içerisinde aparatla deneye devam edildiği için üst kısımlarında az da olsa açıklık kalmaktadır. Bundan dolayı da buharlaşma gözlenmektedir. Deneylerin sabit PBS sıvısı hacminde devam etmesi için 5 günde bir olacak şekilde 0,75 ml PBS ilave edilmiştir. Böylelikle buharlaşma etkisi telafi edilmiştir. Biyobozunma deneylerinin inkübatör içerisinden görüntüsü Şekil 2.17'de verilmiş olup 15, 30, 60, 90 ve 120 gün boyunca biyobozunma deneylerine devam edilmiştir. Periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışı su emilimi, kütle kaybı ve mekanik testlerden elde edilen rijitlik değerleriyle karakterize edilmiştir. Su emilimi biyobozunma günü biten periyodik doku iskelelerinin

yüzeylerindeki su birikintisi kâğıt peçeteyle kurulandıktan sonra ağırlıkları ölçülerek Denklem 2.11 kullanılarak tayin edilmiştir.

$$\text{Su Emilimi (\%)} = \left(\frac{W_i - W_k}{W_k} \right) \times 100 \quad (2.11)$$

W_i doku iskelesinin ıslak haldeki ağırlığı, W_k ise kuru haldeki ağırlığıdır. Ağırlık kaybı ise periyodik doku iskeleleri 48 saat 37 °C’de bekletildikten sonra ağırlıkları ölçülerek Denklem 2.12 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Ağırlık Kaybı (\%)} = \left(\frac{W_b - W_k}{W_k} \right) \times 100 \quad (2.12)$$

W_b doku iskelelerinin başlangıçtaki ağırlığı, W_k ise biyobozunma deneyi sonrası ölçülen kuru ağırlıktır. Mekanik test olarak basma testi kullanılmıştır ve test hızı 0,3 mm/dk olarak seçilmiştir. Basma testinden elde edilen kuvvet-yer değiştirme grafiğinin doğrusal bölgesinin eğiminden de periyodik doku iskelelerinin rijitlik değerleri hesaplanmıştır. Bu şekilde deneysel olarak doku iskelelerinin biyobozunma davranışı karakterize edilmiştir.

2.7 In Vitro Analizler

Bu kısımda periyodik doku iskeleleri üzerine ekilen insan osteoblast (hFOB 1.19) hücreleri üzerine farklı doku iskelesi tasarım parametrelerinin ve mekanik yükün etkileri canlılık, enzim aktiviteleri ve mineralizasyon analizleri yardımıyla incelenmiştir. In vitro analizler şu şekilde yapılmıştır.

- PLA malzemesinin biyoyumluluğunun belirlenmesi
- İnsan osteoblast hücrelerinin (hFOB 1.19) çoğaltılması
- Periyodik doku iskelelerinin sterilizasyonu
- Periyodik doku iskeleleri üzerinde hücrelerin tutunmasının sağlanması için yüzey modifikasyonu ve hücre ekimi
- MTT ((3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolyum bromür)) ile canlılık analizi
- İnsan osteoblast hücrelerinde (hFOB 1.19) osteojenik farklılaşmanın sağlanması

- Alkalen fosfataz enzim aktivitesi
- Mineralizasyon analizi
- Mikro-BT analizi

2.7.1 PLA malzemesinin biyoyumluluğunun belirlenmesi

Periyodik doku iskelelerinin üretiminde kullanılacak PLA malzemesinin biyoyumlulukları sitotoksosite testleri aracılığı ile incelenmiştir. Biyoyumluluk çalışmaları Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik bölümü araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Biyomalzemelerin karakterizasyonu amacıyla biyoyumluluk testlerinin yapılması ve bu testler kapsamında ISO 10993-5 standartlarında hücre toksisitesi üzerine etkilerin değerlendirilmesi gerekmektedir. Son yıllarda, hücre kültüründe sitotoksitenin araştırılması amacıyla pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı, 96 kuyucuklu plaklarda yapılan sitotoksosite testleridir. Bu yöntemlerle hızlı ve kolay şekilde birçok örneğin analizi yapılabilmektedir [66]. PLA malzemesinin hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine olan etkileri 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve nötral kırmızısı alım (NKA) sitotoksosite testleri ile araştırılmıştır. MTT ve NKA sitotoksosite tayin yöntemleri canlı hücre sayısını ve hücrel aktiviteyi değerlendirmek için uygun biyogöstergeler olarak kabul edilmekte ve pek çok biyomalzeme üretimi ile ilgili çalışmada da tercih edilmektedir [67]. MTT yöntemi mitokondride enzimatik reaksiyona dayanırken, NKA yöntemi lizozomlara boyanın alınma derecesini ölçen bir yöntemdir [66]. Bu tez çalışmasında her iki test yöntemi de kullanılarak üretilen PLA iskelelerin hem mitokondriyal hem de lizozomal metabolik aktivite üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

2.7.1.1 PLA malzemesinin ekstrakt çözeltilerinin hazırlanması

Periyodik doku iskelelerinin üretiminde kullanılacak olan PLA malzemesinin biyoyumluluğu filament formunda ve 3 boyutlu yazıcıda üretilmiş küp formunda değerlendirilmiştir. Bu malzemelerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle numuneler steril edilmiştir. PLA'nın yapısal özelliklerinin bozulmaması için sterilizasyon tüm yüzeylerine etki edecek şekilde 30 dk. süreyle UV ışık altında bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Malzemeler steril falkon tüpler içine 50mg/10 ml besi

ortamı (%99 RPMI 1640 ve %1 Penisilin-Streptomisin) olacak şekilde konulmuştur. Bu aşamada protein etkileşimini önlemek amacıyla besiyeri ortamı serum katkısı olmadan hazırlanmıştır. PLA doku iskelelerinin ekstrakt çözeltilerinin elde edilmesi amacıyla tüm örnekler besiyeri ortamında 37 °C etüv içerisinde 72 saat bekletilmiştir.

2.7.1.2 Sitotoksosite testlerinde kullanılan hücre hattı

Sitotoksosite çalışmalarında ISO 10993-5 standartı protokollerinde de önerilen ve referans hücre hattı olarak kabul edilen L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır.

2.7.1.3 Sitotoksosite çalışmalarında kullanılan çözeltiler

Besi ortamı

500 ml RPMI 1640 üzerine 50 ml (%10) FBS ve 5 ml (%1) penisilin/streptomisin eklenmiş ve +4 °C’de saklanmıştır.

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi

50 mg MTT boyası, 10 ml Dulbecco’s Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti membran filtreden steril, ışık geçirmeyen bir tüpe süzölmüştür. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunarak, 4°C’de saklanmıştır.

Nötral kırmızı (NK) stok çözeltisi

0,04 g NK boyası tartılmış ve 10 ml FBS içermeyen besi yeri içerisinde çözülmüştür. 1 saat su banyosunda çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan çözelti alüminyum folyoya sarılarak +4°C’de saklanmıştır.

Nötral kırmızı (NK) standart çözeltisi

Deney gününden bir gün önce 625 µl NK stok çözeltisi 50 ml FBS içermeyen besi yeri ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Membran filtreden süzölmüş, 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

Fiksasyon (Sabitleme) çözeltisi

100 ml etil alkol, 2 ml asetik asit ve 98 ml distile su karıştırılarak hazırlanmış, +4°C’de saklanmıştır.

2.7.1.4 Sitotoksosite testi için hücre kültürü

Çalışma öncesinde -80°C 'de karyotüpler içinde stoklanan hücreler, 37°C 'ye getirilmiş olan su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek oda sıcaklığına getirilmiştir. Steril bir tüp içerisinde 1 ml hücre ve 9 ml besiyeri karıştırıldıktan sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjleme yapılarak süpernatant kısmı atılmıştır. Bu yıkama aşaması ile saklama ortamındaki RPMI uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre pelleti hacimce %90 RPMI, % 10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS), % 1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren besiyeri ile karıştırılarak yatay kültür kapları içerisine aktarılmıştır. 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde kültür edilerek steril ortamda çoğaltılmıştır. 2-3 günlük süre içerisinde hücreler ve besiyeri inverted mikroskopta kontaminasyon durumu ve doyumluğu açısından kontrol edilmiştir. Büyümeye bırakılan hücreler, zemine tutunarak tüm kültür ortamını kapladıkları %70 doyumluğa ulaştıklarında ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada, besiyeri uzaklaştırılıp, hücreler 10 ml ılık PBS ile yıkanarak, üzerine 5 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5 dakika bekletilmiştir. Hücreler yapıştıkları yerden kalkana kadar kültür kabının tabanına hafif hafif vurulmuştur. Steril bir tüpe 10 ml besiyeri konularak, tripsin sayesinde zeminden ayrılarak süspansiyon haline getirilen hücreler eklenmiştir. Hücre süspansiyonu 1000 devir/dakika hızda 25°C 'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı çalışma kabini altında uzaklaştırılmış ve dipte toplanan hücre pelleti 10 ml besiyeri ile dikkatlice karıştırılmıştır. Bu aşamada elde edilen hücre süspansiyonundan 100 μL alınarak bir ependorf tüpe aktararak üzerine 100 μL tripan mavisi çözeltisi (%0,4) eklenerek iyice karıştırılmıştır. Hücre sayım lamı (hemositometre) üzerine lamel yerleştirilerek, yaklaşık 10 μL hücre süspansiyonu kapiler etkiyle doldurulmuştur. Thoma lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra hazırlanan hücreler çoklu pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakalara 200 μL 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Plaka etüve kaldırılarak 24 saat inkübasyona bırakılmış, hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları beklenmiştir. 24 saat sonra yine steril şartlarda besiyeri uzaklaştırılmıştır. Daha önceden hazırlanan filamet ve küp formdaki PLA malzeme ekstraktlarını içeren besiyeri ortamları (%100, %75, %50, %25 oranlarında), negatif kontrol grubu olarak normal besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak %1 Triton X-100 içeren besiyeri 200 μL /kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiş ve 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

2.7.1.5 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi

24 saat inkübasyonun sonunda besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri ve hazırlanan MTT çözeltisinden 10 µl eklenmiştir. Hücreler, 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde 4 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Oluşması beklenen formazan kristalleri 100 µl/kuyucuk olacak şekilde DMSO ile çözülmüştür. Kültür kabı 10 dakika yatay çalkalayıcıya konduktan sonra oluşan renk değişim miktarı spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

2.7.1.6 Nötral kırmızı alım (NKA) yöntemi

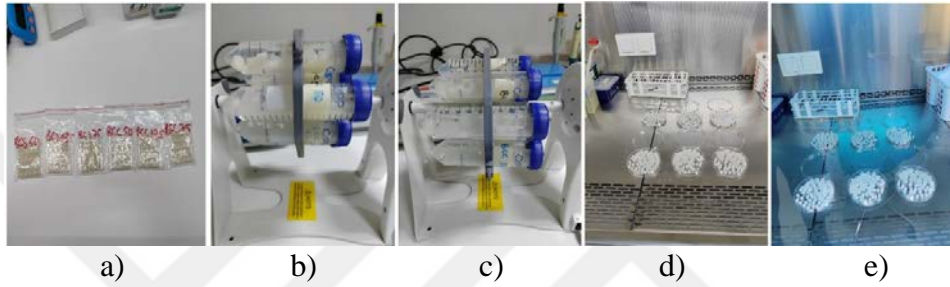
24 saat sonunda plak içindeki test maddesini içeren besiyeri boşaltılmıştır. Bir gün önceden hazırlanan nötral kırmızı çözeltisinden (100 ml besiyeri + 1250 µl Nötral kırmızı stok çözeltisi) her bir kuyucuğa 200 µl eklenmiş ve hücreler 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda plaklardaki boya ters çevrilip dökülerek ortamdan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar 3-4 kez ılık PBS ile yıkanmıştır. Süzgeç kağıdına vurarak plakalar kurutulmuştur. Tüm hücrelere 200 µl %50 metil alkol, %1 glasiyel asetik asit ve %49 distile su karışımından oluşan sabitleyici çözelti eklenmiştir. Plaka çalkalayıcı üzerine yerleştirilerek 20 dakika süre ile çalkalanmıştır. Plakalardaki hücrelerin optik yoğunlukları mikropalak okuyucuda 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu deneyin her aşaması, boya ışıkta bozulduğu için, mümkün olduğunca karanlıkta yapılmıştır.

2.7.2 İnsan osteoblast hücrelerinin (hFOB 1.19) çoğaltılması

hFOB 1.19 hücreleri %10 FBS (Fetal bovine serum) (Gibco), %1 Penisilin-G (100 U/ml)-Streptomisin (100 µg/ml) ve G-418 (0,3 mg/mL) içeren fenol kırmızısı içermeyen DMEM/F12 (Gibco) besiyerinde hücre sayısı bakımından uygun sayıya ulaşana kadar (%70 konfluent) 37°C de ve %5'lik CO₂ içeren kültür ortamında çoğaltılmıştır. İstenilen sayıya (konfluensiye) ulaşan hücreler Trypsin (Tyripsin-EDTA, %0.05, Gibco) ile buldukları kültür flasklarından kaldırılmış ve tripan mavisi metodu ile canlı hücre sayıları belirlenmiştir [68-70].

2.7.3 Periyodik doku iskelelerinin sterilizasyonu

PLA filament kullanılarak üretilmiş periyodik doku iskeleleri hücre ekimi işlemleri öncesinde sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Öncelikle üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskeleleri (Şekil 2.18a) %70'lik etil alkol içerisinde 2 saat boyunca döner çalkalayıcıda çalkalanmıştır (Şekil 2.18b), ardından steril ortam koşullarında alkolden arındırılarak 1xPBS tampon çözeltisinde yıkanmıştır (Şekil 2.18c). Laminer akım içerisinde kurutululan iskeleler (Şekil 2.18d) daha sonra 2 saat boyunca UV ışımaya maruz bırakılmıştır (Şekil 2.18e). Bu işlemlerden sonra çalışmalar sadece steril ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.18: Periyodik doku iskelelerinin sterilizasyon aşamaları. a) periyodik doku iskeleleri, b) alkol sterilizasyonu, c) PBS ile yıkama, d) periyodik doku iskelelerin kurutulması, e) uv sterilizasyonu.

2.7.4 Periyodik doku iskelelerinin yüzey modifikasyonu ve hücre ekimi

%50, %62,5 ve %75 gözenek oranına sahip BCS ve BCC periyodik doku iskeleleri steril edildikten sonra doku iskelesi yüzeyleri Çizelge 2.6'da verilen çeşitli yüzey kaplama malzemeleri ile modifiye edilmiştir. Her bir kaplama malzemesi fenol kırmızısı içermeyen DMEM/F12 ile seyreltilmiştir. Periyodik doku iskeleleri 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına yerleştirildikten sonra yüzeyleri Çizelge 2.6'da verilen yüzey kaplama malzemeleriyle kaplanmıştır. Her bir kaplama malzemesi imalatçı firmaların talimatlarına göre hazırlanmıştır ve en son DMEM/F12 ile hesaplanan konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Periyodik doku iskeleleri bu solüsyonlar içinde İki saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sadece PLA olarak işaretlenmiş iskeleler sadece DMEM/F12 ile inkübe edilmiştir. Bu aşamanın amacı hücrelerin PLA iskeleler üzerinde tutunmasını sağlamaktır. Hücre yapışması malzeme yüzeyi ile protein etkileşimi tarafından kontrol edilmektedir. Kemik hücre dışı matrisi ağırlıklı olarak kollajen tip I ve hidroksiapatitten oluşmaktadır [71,72].

Çizelge 2.6: Yüzey kaplama malzemeleri.

Malzeme Adı	Fonksiyonu	Konsantrasyonu (µg/ml)
Kollajen Tip 1	Ekstrasellüler Matris Proteini	0,04
Fibronektin	Ekstrasellüler Matris Proteini	0,04
Laminin	Ekstrasellüler Matris Proteini	0,04
RGD Peptit	Hücre Adezyonu için Peptit Motifi (Arginilglisilaspartik asit)	0,04
BSA	Bovin Serum Proteini	0,04

2.7.4.1 hFOB 1.19 preosteoblast hücrelerinin çoğaltılması ve yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş periyodik doku iskelelerin üzerine ekilmesi

hFOB 1.19 hücreleri %10 FBS (Fetal bovine serum) (Gibco), %1 Penisilin-G (100 U/ml)-Streptomisin (100 µg/ml) ve G-418 (0,3 mg/mL) içeren fenol kırmızısı içermeyen DMEM/F12 (Gibco) besiyerinde hücre sayısı bakımından uygun sayıya ulaşana kadar (%70 konfluent) 37 °C de ve %5'lik CO₂ içeren kültür ortamında çoğaltılmıştır. İstenilen sayıya (konfluensiye) ulaşan hücreler Tripsin (fenol kırmızısı içermeyen) (Tripsin- EDTA, %0.05, Gibco) ile buldukları kültür kaplarından kaldırılmış ve tripan mavisini metodu ile canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Ardından yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş doku iskelelerine, doku iskelesi başına 1x10⁵ hücre olacak şekilde doku iskeleleri için özel basılmış olan kutucuklar içinde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yüzeye uyum sağlaması ve tutunması için 24 saat 37 °C de ve %5'lik CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücre ekimi yapılmış doku iskeleleri 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına alınmış ve taze besiyeri eklenerek 48 saat 37 °C de ve %5'lik CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

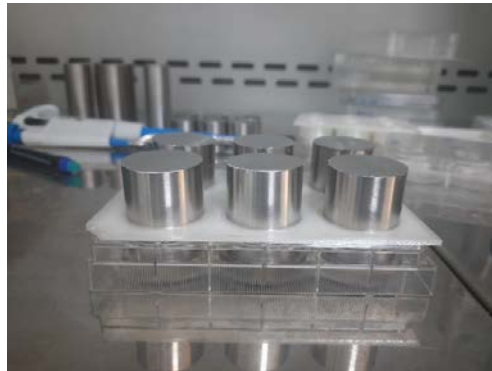
2.7.4.2 hFOB 1.19 hücrelerinin kaplanmış PLA malzemesi üzerindeki morfolojilerinin Phalloidin 488 sitoiskelet boyaması ile tayini

PLA malzeme üzerindeki farklı kaplama malzemelerinin hücre morfolojisini değerlendirmek için kare formda PLA malzemesinden düz plakalar 3 boyutlu yazıcıyla üretilmiştir. Bu plakaların kenar uzunluğu 5 mm ve kalınlığı ise 2 mm'dir. Sterilizasyon işleminden sonra hFOB 1.19 preosteoblast hücrelerinin çeşitli yüzey kaplamalarıyla kaplanmış olan PLA malzeme üzerindeki morfolojilerini belirlemek amacıyla floresan Phalloidin boyaması yapılmıştır. Phalloidin 488 boyaması, hücre

iskeletin özellikle aktin filamentlerini görselleştirmek için kullanılan bir tekniktir [73]. Aktin filamentleri, hücre içindeki yapının korunmasında, hücre hareketlerinde, adezyonunda ve hücre bölünmesi gibi önemli hücresel süreçlerde rol oynarlar [74]. Bu amaçla PLA kare plakalar Çizelge 2.6'da verilmiş kaplama malzemeleriyle Bölüm 2.4.6'da belirtildiği şekilde kaplanmış ve hFOB 1.19 hücreleri (5×10^3) her bir PLA plakanın üzerine ekilmiştir. 24 saat 37°C de ve %5'lik CO_2 ortamında besiyeri içerisinde inkübe edildikten sonra besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından 1xPBS ile yıkanan iskeleler üzerindeki hücreler %4'lük paraformaldehit (pbs içinde) içerisinde oda sıcaklığında 15 dakika sabitlenmiştir. Fiksatif ortamdan uzaklaştırılmıştır ve 0,1% Triton-X-100 içeren ve hücrelerin geçirgenliğini arttıran yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Ardından imalatçı firmanın talimatlarına göre Phalloidin 488 boyası %1 BSA içeren 1xPBS solüsyonunda hazırlanmış ve PLA plaklar üzerine bırakılmıştır. Oda sıcaklığında 40 dakikalık inkübasyonun ardından hücre çekirdeklerini tayin edebilmek için Hoechst 33342 ($3\mu\text{g}/\text{mL}$) nükleik asit boyası eklenmiş ve 10 dakika daha inkübe edilmiştir. Ardından hücrelerin çekirdek ve aktin mikrofilament görüntüleri EVOS M5000, Invitrogen floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir.

2.7.5 Hücre ekimi ve mekanik yüklerin hücre ekimi gerçekleştirilmiş periyodik doku iskelelerine uygulanması

Periyodik doku iskelelerine hücre ekimi 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında doku iskelesi başına 1×10^5 adet hücre olacak şekilde yapılmıştır. Hücre ekiminden sonra hücrelerin doku iskelesi yüzeylerine tutunabilmeleri için 24 saat boyunca 37°C ' de inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Mekanik yükün etkisini değerlendirebilmek için kontrol grubuna yük uygulanmamıştır. Hücre ekimi gerçekleştirilmiş doku iskeleleri üzerine 1 N ve 2 N'luk mekanik yük günde 30 dakika boyunca uygulanmıştır.



Şekil 2.19: Periyodik doku iskeleleri üzerine mekanik yükün uygulanması.

Uygulanan mekanik yükler 316 paslanmaz çelikten işlenmiştir. Yükler doku iskelelerine uygulanmadan önce steril edilmiştir. Mekanik yükler Şekil 2.19’da gösterildiği gibi 6 kuyucuklu hücre kapları içerisinde uygulanmıştır. Mekanik yük uygulaması tamamlandıktan sonra doku iskeleleri tekrar 24 kuyucuklu hücre kapların içerisine alınmıştır.



Şekil 2.20: 24 kuyucuklu hücre kültür kabının içindeki periyodik doku iskeleleri.

2.7.6 MTT canlılık analizi

MTT canlılık analizleri 24 saatlik tutunma süresinden 48 saat sonra yapılmıştır. Canlılık analizinde 2 N’luk mekanik yük kullanılmış olup günde 30 dakika olarak uygulanmıştır. Canlılık analizleri %50 ve %75 gözenek oranına sahip periyodik doku iskeleleri için yapılmıştır. PLA doku iskeleleri üzerindeki hFOB 1.19 hücreleri üzerine uygulanan statik yükün hücreler üzerinde olası etkilerini değerlendirmek üzere MTT canlılık testi uygulanmıştır. 5 mg/ml MTT (M5655, Sigma-Aldrich) stok solüsyonu PBS, pH 7.2 içinde hazırlanıp filtre edilmiştir. Statik yük uygulanmış ve uygulanmamış kontrol hücrelerinin üzerine MTT solüsyonu eklenmiş ve 4 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra solubilizasyon tampon çözeltisi (0.01 N HCL içinde çözülmüş %10 sodyum dodesil sülfat) eklenerek gece boyunca inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı 570 nm’de absorbanları okunarak tayin edilmiştir. Canlı hücreler koyu mavi-mor formazan kristallerini oluşturmuştur ancak ölü hücrelerde böyle bir renk değişimi gözlenmemiştir. Hücre canlılığı Denklem 2.13 ile hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned} & \text{Hücre Canlılığı (\%)} \\ & = (\text{Örnek Absorbansı}/\text{Kontrol Absorbansı}) \times 100 \end{aligned} \quad (2.13)$$

2.7.7 İnsan osteoblast hücrelerinde (hfob 1.19) osteojenik farklılaşmanın sağlanması

Mekanik yükün hFOB 1.19 hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hFOB1.19 hücreleri ekilen periyodik doku iskelelerinde hücrelerin farklılaşması osteojenik farklılaşma mediumunda gerçekleştirilmiştir ve öncesinde yine mekanik yük uygulanmıştır. Osteojenik farklılaşma mediumu %10 FBS, %1 Penisilin-G (100 U/ml)-Streptomisin (100 µg/ml), G-418 (0,3 mg/mL), 50 µg/ml Askorbik asit (A7506, Sigma-Aldrich), 10 mM β-Gliserofosfat (G-9422, Sigma-Aldrich) ve 10⁻⁸ M Deksametazon (D4902, Sigma-Aldrich) ve fenol kırmızısı içermeyen DMEM/F12 (31-053-028, Gibco) den oluşmaktadır. hFOB 1.19 hücreleri doku iskelelerine ekildikten 24 saat sonra hücreler 1x PBS ile yıkanmış, günde 30 dakika mekanik yük uygulanıp, osteojenik farklılaşma mediumu eklenmiştir. Hücreler 7 gün süre ile farklılaşma mediumunda, 37°C de ve %5'lik CO₂ içeren kültür ortamında kültür edilmiştir. Farklılaşma mediumu her üç günde bir taze farklılaşma mediumu ile değiştirilmiştir [71].

2.7.8 Alkalen fosfataz enzim aktivitesi

Periyodik doku iskelesi üzerindeki hücrelere uygulanan mekanik yükün kemik oluşumu üzerine olası etkilerini değerlendirebilmek için Alkalen fosfataz enzim aktivitesi kolorometrik olarak ölçülmüştür. Bunun için Alkaline phosphatase Assay kiti (ab83369 Alkaline Phosphatase Assay Kit, Abcam) kullanılmıştır. Kısaca mekanik yük uygulanmış ve osteojenik farklılaşma ortamında büyütülmüş hücreler Tryple Express yardımı ile iskelelerden ayrılmıştır. hFOB 1.19 hücreleri 100 µl lizis tampon çözeltisi (10 mM tris-HCL, 2 mM MgCl₂, % 0.05 Triton X-100 ile tekrar süspansiyon haline getirilmiş ve buz üzerinde lizis edilmiştir. Ardından santrifüj edilerek supernatanları toplanmıştır. 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının her bir kuyusuna 100 µl p-nitrofenol içeren çalışma solüsyonu eklendikten sonra üzerine 20 µl lizat eklenmiştir. 25 °C' de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinin sonunda 80 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Absorbans değerleri 405 nm de mikropate reader ile ölçülmüştür. Standartlarla standart eğrisi oluşturularak enzim aktivitesi Denklem 2.14 ile hesaplanmıştır [76,77].

$$\begin{aligned} \text{ALP Enzim Aktivitesi } (\mu\text{mol/dakika/ml veya U/ml}) \\ = ((B/\Delta T) \times V) \times D \end{aligned} \quad (2.14)$$

B: Örnekteki pNp miktarı (standard eğriden hesaplanır, μmol)

ΔT : Reaksiyon zamanı (dakika)

V: Reaksiyon kuyusuna eklenen örnek hacmi (ml)

D: Örnek dilüsyon faktörü

Alkalin fosfataz enzim analizi %50 ve %75 gözenek geometrisine sahip periyodik doku iskeleleri için gerçekleştirilmiştir. 2 N'luk mekanik yük osteojenik farklılaşmadan sonra 7 gün boyunca günde 30 dakika olarak uygulanmıştır. Aynı şartlar altında mekanik yükün uygulanmadığı periyodik doku iskeleleri kontrol grubu olarak kabul edilmiştir.

2.7.9 BCA protein analizi

Protein konsantrasyon tayini için "Pierce™ BCA Protein Assay Kit" kullanılmıştır. Standard oluşturmak amacıyla BSA proteininin; 2-1,6-1,2-0,8-0,4-0,2 ve 0 mg/ml konsantrasyonları distile su ile hazırlanmış ve Standartlar ve konsantrasyonu belirlenecek PLA doku iskeleleri üzerinden izole edilmiş hFOB 1.19 hücrelerinin lizatlarından 5 μl , 3 tekrarlı olarak 96-kuyucuklu hücre kültürü plakasına pipetlenmiştir. Kuyulara 195 μl "Çalışma Çözeltisi" ekledikten sonra ve hücre plakası 37°C, %5'lik CO₂'li inkübatörde 30 dakika inkübe edilmiştir. Renk şiddeti, 30 dakika sonunda 570 nm. 'de spektrofotometre ile ölçülmüş ve her bir örneğin protein konsantrasyonu BSA protein standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

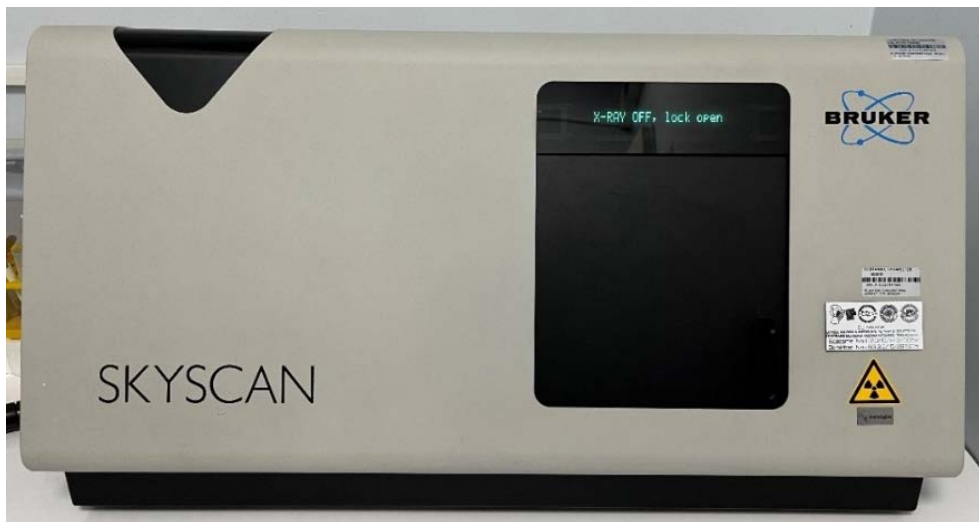
2.7.10 Mineralizasyon analizi

Mineralize olmuş nodül oluşumu geç osteojenik farklılaşmada önemli bir belirteçdir [78]. Mineralizasyon analizinde BCS-BCC gözenek geometri ve %50-%75 gözenek oranına sahip periyodik doku iskeleleri kullanılmıştır. Periyodik doku iskelesi üzerindeki hücrelere uygulanan mekanik yüklerin mineralizasyon üzerine etkilerini belirlemek amacıyla periyodik doku iskeleleri osteojenik farklılaşma ortamına alındıktan sonra günde 30 dakika olmak üzere 1 N ve 2 N'luk mekanik yük 21 gün boyunca uygulanarak mineral oluşumları takip edilmiştir. Yük uygulanmayan ancak hFOB 1.19 sağlıklı osteoblast hücreleri ekilmiş doku iskelelerinde oluşacak mineraller kontrol grubu olarak belirlenmiştir. 21 günlük mekanik yük ve inkübasyon süresinin ardından doku iskeleleri 1x PBS ile yıkanmış, ardından soğuk %70'lik etanol ile 1 saat +4°C'de fiksasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra dH₂O ile fazla alkol uzaklaştırılmış

ve % 0,4'lük Alizarin Kırmızısı-S (A5533, Sigma-Aldrich) eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Alizarin Kırmızısı-S histolojide kalsiyum depozitlerini tayin etmekte kullanılan, kalsiyuma bağlandığında turuncuyla kırmızı arası bir renk görünümü veren suda çözünebilen bir boyadır [79]. Bağlanmayan fazla boya uzaklaştırıldıktan sonra öncelikle 1x PBS ile 15 dakika inkübe edilmiş ardından önce %70'lik sonra %100'lük etil alkol ile dehidrasyon gerçekleştirilmiştir. Kurumaya bırakılan örnekler inverted mikroskop ile incelenip mineralize olmuş kalsiyum depozitleri fotoğraflanmıştır. Kantitatif kalsiyum değerinin hesaplanabilmesi için yukarıdaki boyama işlemi tamamlandıktan sonra 1x PBS içinde hazırlanan %5'lik (w/v) setilpiridinyum klorür (C0732, Sigma-Aldrich) ile gece boyunca çalkalanarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün supernatant absorbansları 570 nm'de mikro plaka okuyucu ile ölçülerek kalsiyum değerleri hesaplanmıştır [80].

2.7.11 Mikro-BT taraması

Mikro-BT cihazı ile bilgisayarlı tomografi cihazları birbirine oldukça benzer çalışma prensiplerine sahiptirler. Bilgisayarlı tomografi cihazında hasta sabit dururken dedektör ve x ışını kaynağı dönmektedir. Mikro-BT cihazında ise dedektör ve x ışını kaynağı sabitken numune kendi ekseninde etrafında dönmektedir [81]. Mikro-BT cihazlarında titreşim daha az meydana geldiği için daha yüksek çözünürlüklü görüntüler almak mümkündür. Bundan dolayı da diş dokusunda, sert dokularda ve kemik mineral analizi gibi akademik uygulamalarda mikro-BT cihazları yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [88].



Şekil 2.21: SKYSCAN 1174 mikro-BT cihazı.

Periyodik doku iskeleleri üzerindeki hFOB 1.19 hücrelerinin oluşturduğu mineralleri analiz edebilmek için mikro-BT taraması gerçekleştirilmiştir. Mikro-BT analizi %50-%75 gözeneklilik oranına ve BCS-BCC gözenek geometrilerine sahip doku iskelelerine uygulanmıştır. Bu periyodik doku iskeleleri osteojenik farklılaşma ortamına alındıktan sonra 21 gün boyunca günde 30 dakika olmak üzere 1 N ve 2 N mekanik yüke maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak ise ayrıca mekanik yük uygulanmamış doku iskeleleri kullanılmıştır. 21 günün sonunda doku iskeleleri 1xPBS ile yıkandıktan sonra %10 formalin ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilerek mikro-BT analizi için doku iskelesi numuneleri hazır hale getirilmiştir.

Tez kapsamında kemik doku iskelelerinin mikro-BT görüntü taramaları İstanbul Üniversitesi 3 Boyutlu Tıbbi ve Endüstriyel Tasarım Laboratuvarında (3B TETlab) bulunan ve Şekil 2.21’de verilen SKYSCAN 1174 Mikro-BT cihazıyla yapılmıştır. Ayrıca mikro-BT taramasıyla kemik mineral yoğunluğu değerleri de (BMD) ölçülebilmektedir [83]. Mikro-BT taramasında kullanılan parametreler Çizelge 2.7’de verilmiştir.

Çizelge 2.7: Mikro-BT tarama parametreleri.

Kaynak Akımı (μ A)	604
Kaynak Voltajı (kV)	44
Görüntü Piksel Boyutu (μ m)	8,03
Pozlama Süresi (ms)	2100
Dönme Adımı (derece)	0,600
Filtre	0,25 Al
Tarama Süresi (Dakika)	50

2.8 Kemik Yeniden Yapılanma Modeli

Mekanik kuvvetlerin kemik yapımı ve yıkımı üzerine etkileri Julius Wolff’ tan bu yana birçok bilim insanı tarafından çalışılmıştır. Frost lokal birim şekil değişimlerinin kemik kütlelerinin değişimi üzerine etkisi olduğunu varsayan mechanostat teorisini ele almıştır [84]. Bu teoriye göre birim şekil değiştirme seviyesi belli bir eşik değerini geçerse yeni kemik dokusu oluşacaktır aksi takdirde kemik dokusunun yıkımı gerçekleşecektir. Bu teori kemik oluşumu için birçok farklı teorisinin matematiksel olarak ifade edilebilmesini sağlamıştır. Bu yaklaşımlar sayesinde kemik yapımında mekanik etkinin önemli bir rolü olduğu bilindiği için kemik üzerinde meydana gelen gerilme ve birim şekil değiştirmelerin hesaplanması gereklidir. Bunun için sonlu elemanlar yöntemi kullanılmaktadır. Tez kapsamında kullanılan kemik yeniden

yapılanma teorisi birim şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu esasına dayanmaktadır. Weinans ve diğ. (1992) yapmış oldukları çalışmada, kemik yeniden yapılanması için birim şekil değiştirme enerjisi yoğunluğunu (strain energy density) (SED) kullanmışlardır. Bu teoriye göre kemik yoğunluğunun değişimi

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = B(S - k), \quad 0 < \rho \leq \rho_{cb} \quad (2.15)$$

ile tanımlanır. Burada B sabit, $S=S(x,y,z)$ mekanik uyarı ve $k=k(x,y,z)$ eşik değerdir [81]. Bu teori sonlu elemanlar yöntemiyle birleştirildiği zaman, S her bir eleman için ayrı olarak hesaplanır. Bu durumda her bir elemenda mekanik yüklemeyi algılayacak bir sensör olduğu varsayılır. Denklem 2.15'teki S 'in yerine mekanik uyarı olarak birim şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu (SED) düşünülmüştür. Denklemdeki birim şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu (SED) U/ρ ile hesaplanmıştır. Burada U kemiğin birim şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu ve ρ ise kemik yoğunluğudur. Böylece U/ρ birim kemik kütlesi başına birim şekil değiştirme enerjisini temsil eder. Böylelikle Denklem 2.13

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = B \left(\frac{U}{\rho} - k \right), \quad 0 < \rho \leq \rho_{cb} \quad (2.16)$$

haline gelir. Bu denkleme göre eşik değer ile birim şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu arasında bir fark olduğu zaman kemik yoğunluğunda değişim gözlenecektir. Eğer bu fark pozitifse kemik yapımı negatifse kemik yıkımı gerçekleşecektir. Denklem 2.16'yı kullanarak kemik yoğunluğundaki değişimi gözlemleyebilmek için sonlu elemanlar analizinden her bir eleman üzerinden birim şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu olan U değerlerinin alınması gerekmektedir. Bu U değerine göre kemik yoğunluğundaki değişimi hesapladıktan sonra kemiğin yoğunluğu değişeceği için mekanik özellikleri de değişecektir. Tekrar mekanik yükleme gerçekleştirildikten sonra birim şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu değişeceği için buna bağlı olarak Denklem 2.16 kullanılarak tekrar yoğunluk değişimi hesaplanacaktır. Bu şekilde döngüsel sonlu elemanlar analizi çalıştırılırsa gerçek durumdaki kemik yoğunluk dağılımı elde edilecektir. Weinans ve diğ. (1992) çalışmalarında B katsayısını $1.0 (g \text{ cm}^{-3})^2 (MPa \times \text{time unit})^{-1}$ ve k eşik değerini $0.004 J/g$ olarak almışlardır. Kemik yoğunluğuna bağlı olarak kemiğin elastisite modülünü

$$E = Cx\rho^3 \quad (2.17)$$

ile hesaplamışlardır. Burada C sabittir ve değeri $3790 \text{ MPa}(\text{gcm}^3)^{-3}$ dır. ρ ise kemiğin yoğunluğudur. Kemik yeniden yapılanma teorisinin sonlu elemanlar kodlarına nasıl entegre edildiği EK D’de verilmiştir.

Kemik yapılanma modeli sonuçlarının Bölüm 2.7’deki in vitro analizlerle kıyaslanabilmesi için uygulanan mekanik yük süresi de 30 dakikadır.

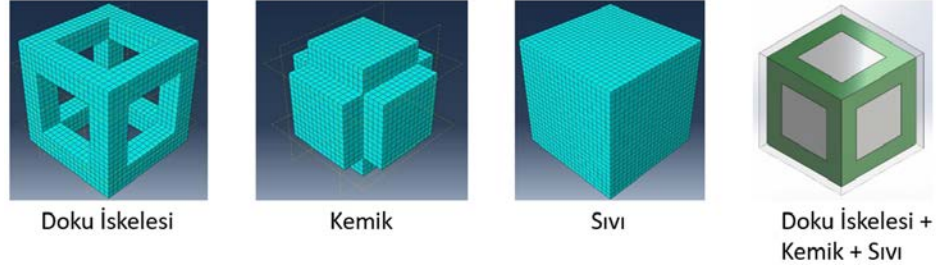
2.9 In Silico Modelin Oluşturulması

Periyodik doku iskelelerinin kemik yeniden yapılanma davranışını bilgisayar üzerinde simülasyonlarını gerçekleştirmek için in silico bir model geliştirilmiştir. Geliştirilen bu in silico model sonlu elemanlar yöntemini kullanmaktadır. Tez çalışması kapsamında kemik yeniden yapılanma süreçlerinin esnek bir şekilde uygulanabilmesi için paket sonlu elemanlar programı kullanmak yerine MATLAB ortamında 3 boyutlu sonlu elemanlar algoritması geliştirilmiştir. Sonlu elemanlar algoritması lineer-elastik malzeme modeline dayalı olduğu için elastisite modülü ve poisson oranı değerleri malzeme özelliği olarak tanımlanmıştır. Ayrıca sonlu elemanlar analizine mesnet şartları ve kuvvet değerleri sınır şartı olarak tanımlanmıştır. Geliştirilen 3 boyutlu sonlu elemanlar algoritması kullanılarak oluşturulan in silico model Şekil 2.22’de verilmiştir.



Şekil 2.22: In silico model [85].

In silico modelde Şekil 2.23’te gösterildiği gibi doku iskelesi, kemik dokusu ve sıvıyı temsil eden 3 farklı tipte malzeme kullanılmıştır ve her biri farklı malzeme özelliklerine sahiptir.



Şekil 2.23: In silico modelde kullanılan malzeme tipleri.

Şekil 2.22’de gösterilen in silico model çevrimsel olarak çalışacak şekilde tasarlanmıştır. Her çevrimde doku iskelesi ve kemik dokusunu temsil eden elemanların malzeme özellikleri sonlu elemanlar analizinden alınan gerilme ve birim şekil değiştirme değerleri kemik yeniden yapılanma algoritmasında kullanılarak bir sonraki çevrim için tekrar hesaplanmaktadır. Hesaplanan yeni malzeme özellikleri malzeme tablosuna kaydedilmektedir.

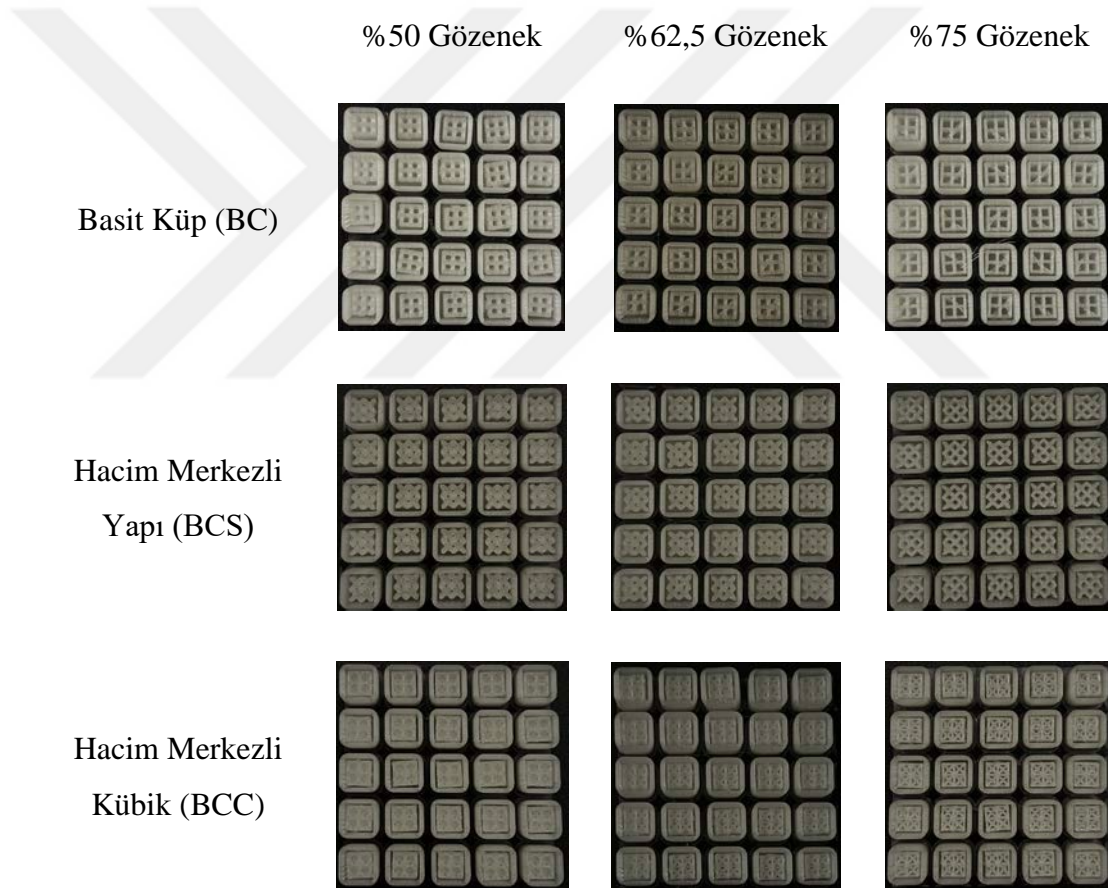
2.10 İstatistiksel Analizler

Deneysel sonuçlar grafiklerde ortalama ve standart sapma ile verilmiş olup sonuçlar arasında anlamlı farklılık tek yönlü veri analizi ANOVA ve Bonferroni post hoc test ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

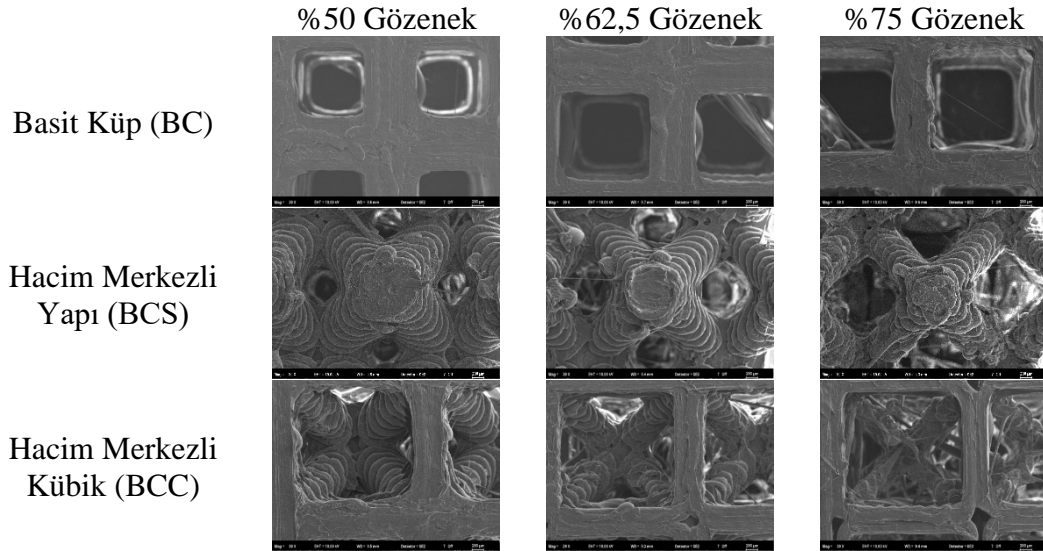
3.1 3 Boyutlu Yazıcıyla Üretilmiş Periyodik Doku İskelesi Geometrileri

Çizelge 2.1’de verilen tasarım parametreleri kullanılarak tasarlanan 2x2x2 periyodik doku iskelelerinin üretimleri PLA filament ve Bölüm 2.2’de verilen üretim parametreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1’de üretimi gerçekleştirilen 2x2x2 periyodik doku iskelelerinin resimleri verilmiştir.



Şekil 3.1: Üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskeleleri.

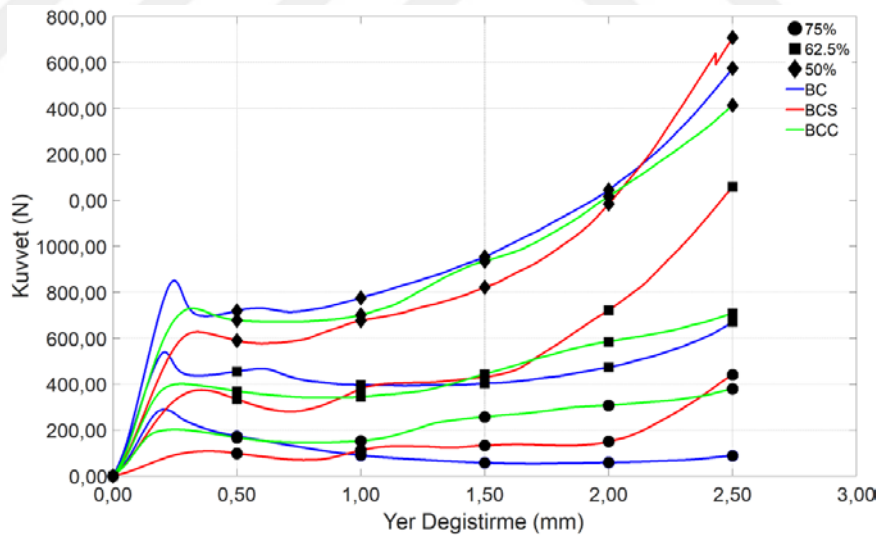
Üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskelelerinin gözeneklerinin detaylı olarak incelenebilmesi için taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Taramalı elektron mikroskobundan elde edilen görüntüler Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2: Üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskelelerinin sem görüntüleri.

3.2 Periyodik Doku İskelelerinin Mekanik Karakterizasyonu

Üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskelelerinin mekanik davranışını belirlemek için Bölüm 2.3'te verilen test parametreleriyle basma testleri gerçekleştirilmiştir. Basma testinden elde edilen kuvvet-yer değiştirme grafiği Şekil 3.3'te verilmiştir.

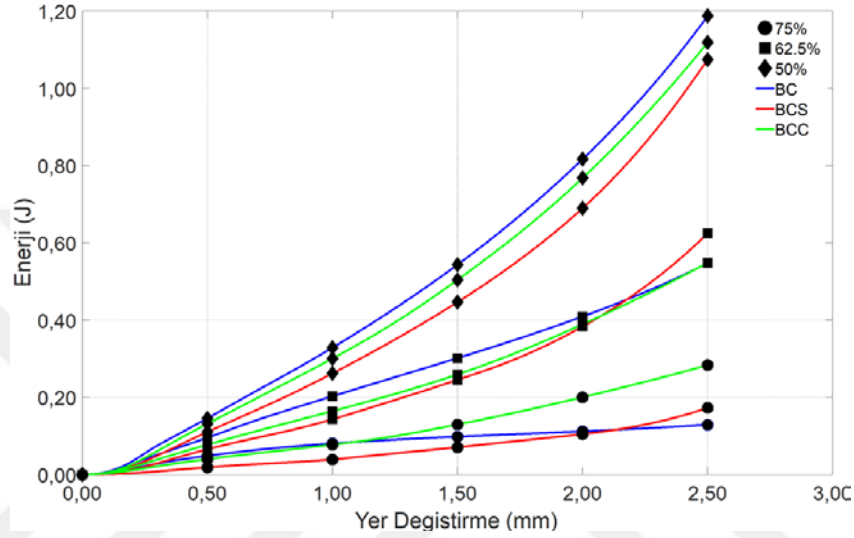


Şekil 3.3: Periyodik doku iskelelerinin kuvvet-yer değiştirme grafiği.

Basma testi sonuçları tüm periyodik doku iskeleleri için 2,5 mm yer değiştirme değerine kadar verilmiştir ki bu yaklaşık %45 kadar bir deformasyonu temsil etmektedir.

Üç farklı gözenek geometrisine ve gözeneklilik oranına sahip periyodik doku iskelelerinin tasarımları gerçekleştirildikten sonra mekanik karakterizasyonları deneysel olarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.3'teki kuvvet-yer değiştirme grafiği

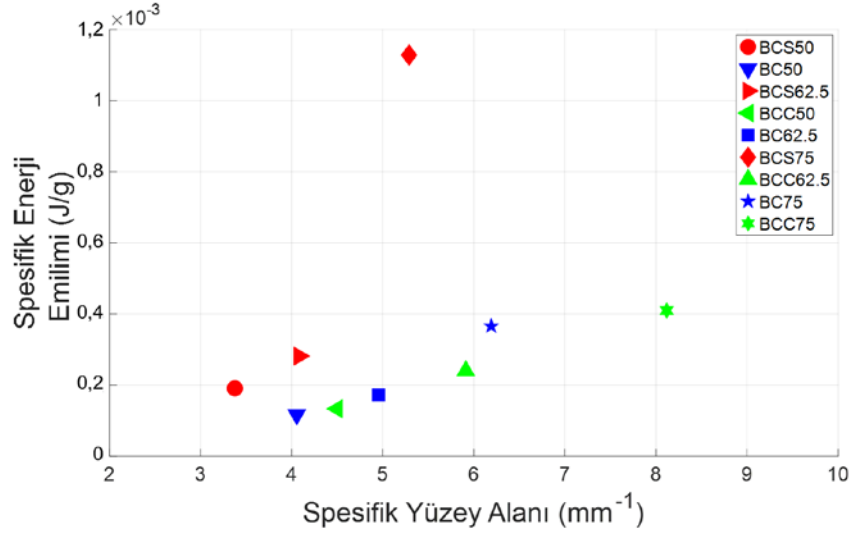
incelendiği zaman periyodik doku iskeleleri 3 farklı davranış sergilemiştir. Bunlar lineer, plato ve güçlenme bölgeleridir [86]. Gözeneklilik oranı arttıkça tüm doku iskelesi geometrilerinde ortaya çıkan kuvvet değerlerinde azalma gözlemlenmiştir. Lineer ve plato bölgesinde BC geometrili doku iskelelerinde daha yüksek kuvvet değeri gözlemlenmesine rağmen 2,5 mm yer değiştirme değerine geldiği zaman BCS geometrili doku iskelelerinin kuvvet değeri daha yüksektir. Bunun sebebi BCS doku iskelelerinin güçlenme bölgesine daha erken girmesidir.



Şekil 3.4: Periyodik doku iskelelerinin enerji-yer değiştirme grafiği.

Basma testinden elde edilen kuvvet-yer değiştirme verileri kullanılarak periyodik doku iskelelerinin şekil değiştirme enerjileri hesaplanmıştır. Şekil 3.4'te periyodik doku iskelelerinin enerji-yer değiştirme grafikleri verilmiştir. Gözeneklilik oranı azaldıkça absorbe edilen enerji miktarı artmıştır. Periyodik doku iskelelerinin lineer, plato ve güçlenme bölgelerindeki davranışları doğrudan enerji absorbe etme davranışlarını da etkilemektedir.

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak doku iskelelerinin spesifik enerji emilimi ve spesifik yüzey alanı değerleri de önemlidir. Spesifik enerji emilimi doku iskelesinin absorbe etmiş olduğu şekil değiştirme enerjisi değerinin kütlesine bölümüyle elde edilmiştir. Spesifik enerji emilimi değerlerini hesaplamak için periyodik doku iskelelerinin 4 N yüke kadar absorbe ettikleri şekil değiştirme enerjisi değerleri kullanılmıştır. Spesifik yüzey alanı ise doku iskelesinin yüzey alanının hacmine bölümüyle hesaplanmıştır. Yüzey alanı ve hacim değerleri katı tasarım programından elde edilmiştir. Şekil 3.5'te periyodik doku iskelelerinin spesifik enerji emilimi-spesifik yüzey alanı grafiği verilmiştir.

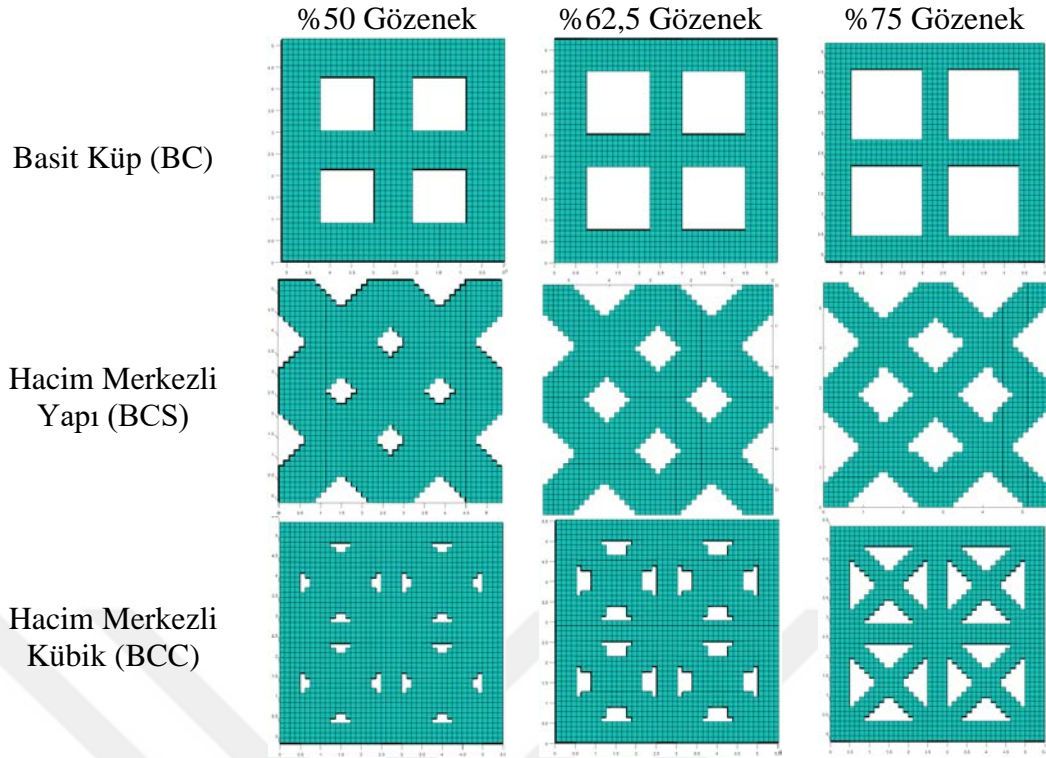


Şekil 3.5: Periyodik doku iskelelerinin spesifik enerji emilimi-spesifik yüzey alanı grafiği.

Şekil 3.5'teki grafiğe göre en yüksek spesifik enerji emilimi değerine BCS75 isimli doku iskelesi sahiptir. Bunun nedeni ise bu doku iskelesinin en düşük rijitlik değerine sahip olmasıdır. Bundan dolayı 4 N yük altında en yüksek şekil değiştirme enerjisi değerine sahiptir. İkinci en yüksek spesifik enerji emilimi değerine ise BCC75 isimli doku iskelesi sahiptir. Bu doku iskelesi de en düşük ikinci rijitlik değerine sahiptir. Ayrıca BCC75 doku iskelesi en yüksek spesifik yüzey alanı değerine sahiptir.

3.3 Periyodik Doku İskelelerinin Sonlu Elemanlar Analizi

Periyodik doku iskelelerinin sonlu elemanlar yöntemiyle mekanik karakterizasyonu MATLAB üzerinde oluşturulmuş olan 3 boyutlu sonlu elemanlar analizi kodlarıyla gerçekleştirilmiştir. Sonlu elemanlar analizinde malzeme modeli olarak lineer-elastik malzeme modeli kullanılmıştır. Bundan dolayı malzeme özelliği olarak elastisite modülü ve poisson oranı değerleri tanımlanmıştır. Doku iskelesi malzemesinin elastisite modülü BC75 isimli doku iskelesinin basma testinden elde edilen rijitlik değeriyle sonlu elemanlar analizinden elde edilen rijitlik değeri birbirine eşitlenerek 1350 MPa olarak bulunmuştur. Poisson oranı ise 0,3 olarak alınmıştır. Kullanılan sınır şartları Bölüm 2.4.2'de verilmiştir. Periyodik doku iskeleleri Bölüm 2.4.1'de anlatılan yöntemle meshlenmiştir. Şekil 3.6'da periyodik doku iskelelerinin mesh görüntüleri verilmiştir. Kullanılan mesh elemanlarının bir kenar uzunluğu 0,125 mm'dir.



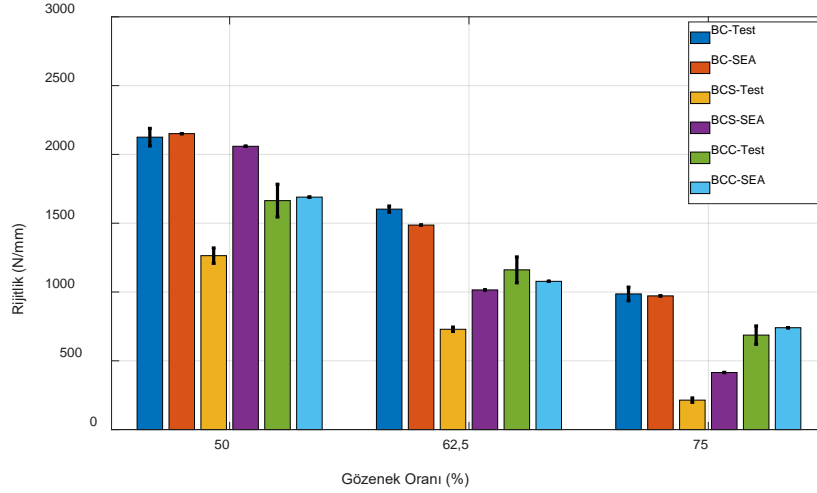
Şekil 3.6: Periyodik doku iskelelerinin mesh görüntüleri.

Çizelge 3.1’de ise her bir doku iskelesinin eleman sayısı verilmiştir.

Çizelge 3.1: Periyodik doku iskelelerinin eleman sayıları.

Periyodik Doku İskelesi	Eleman Sayısı
BC50	35721
BC62,5	29160
BC75	22275
BCS50	48690
BCS62,5	44062
BCS75	32425
BCC50	43704
BCC62,5	33840
BCC75	24320

Periyodik doku iskelelerinin basma testinden elde edilen kuvvet-yer değiştirme grafiklerinin lineer bölgesinin eğiminden rijitlik değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler sonlu elemanlar analizinden elde edilen rijitlik değerleriyle kıyaslanmış olup Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7: Periyodik doku iskelelerinin rijitlik sonuçları.

DeneySEL ve sonlu elemanlar analizinden elde edilen rijitlik değerleri birbiriyle kıyaslandığı zaman gözeneklilik oranının artmasıyla beraber rijitlik değerlerinin düştüğü görülmüştür. BC doku iskeleleri sadece yatay ve düşey çubuklardan oluştuğu için rijitlik değerleri diğer doku iskelelerinden daha yüksektir. BCS doku iskeleleri ise sadece açılı çubuklardan oluşmaktadır. Bundan dolayı da en düşük rijitlik değerlerine sahiptir. Ayrıca BCS doku iskeleleri hariç diğer doku iskelelerinin deneysel ve sonlu elemanlar analizi sonuçları birbiriyle oldukça uyumlu çıkmıştır. Bunun sebebinin BCS doku iskelelerinin sadece açılı çubuklardan oluştuğu ve çubukların birleşim noktalarında üretim kusurlarının olduğu değerlendirilmiştir.

Periyodik doku iskelelerinin in vitro analizlerde kullanılan 1 N ve 2 N yük altındaki ve biyobozunma deneylerinde kullanılan 4 N yük altındaki Von Mises gerilme ve eş değer birim şekil değiştirme dağılımları EK E’de verilmiştir. Von Mises gerilmeleri MPa cinsinden, eş değer birim şekil değiştirme değerleri ise $\mu\epsilon$ cinsinden verilmiştir.

3.4 Periyodik Doku İskelelerinin Biyobozunma Davranışı

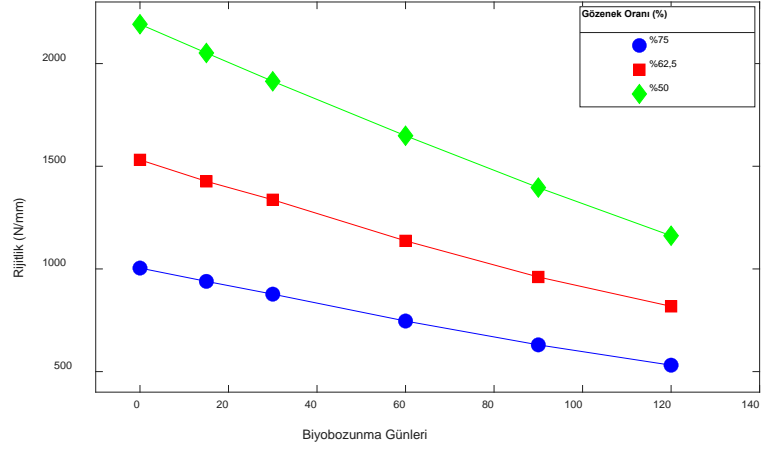
Periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışı hem nümerik olarak hem de deneysel olarak 4 N’luk mekanik yük etkisi altında incelenmiştir. Nümerik olarak iki farklı biyobozunma modeli ele alınmıştır. Bu modellerden ilki birinci dereceden kinetik model olarak adlandırılmaktadır ve bir biyobozunma katsayısı ile tüm doku iskelesi elemanlarının moleküler ağırlığının düştüğünü kabul etmektedir. Ayrıca bu model uygulanan mekanik yükü de biyobozunma davranışına dahil etmektedir. Diğer nümerik model ise difüzyon esaslı biyobozunma modelidir. Bu modele göre doku

iskelesi elemanlarının içerisindeki su konsantrasyonuna göre moleküler ağırlık değişimleri hesaplamaktadır. Periyodik doku iskelelerinin mekanik yük etkisi altında biyobozunma deneyleri ise 15, 30, 60, 90 ve 120 gün boyunca 37 °C’de gerçekleştirilmiştir.

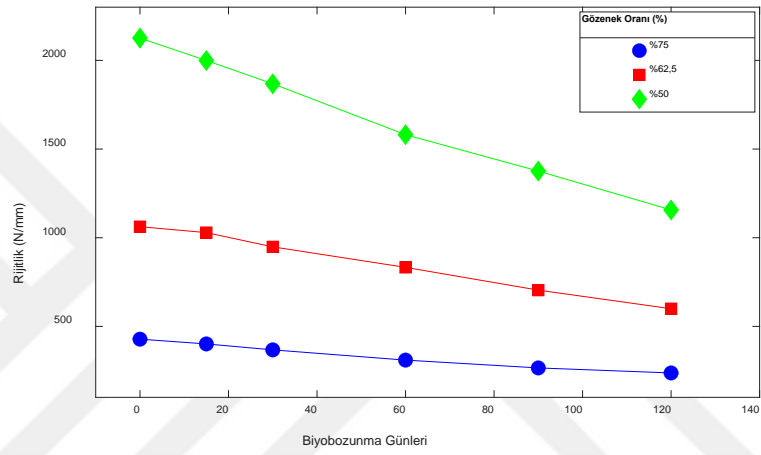
3.4.1 Birinci dereceden kinetik biyobozunma modeli

Mekanik yük etkisi altında periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışını analiz etmek için Şekil 2.10’da verilen algoritma 120 çevrim boyunca çalıştırılmıştır. Bu algoritmadaki her çevrim 1 güne karşılık gelmektedir. Mekanik yük değeri 4 N olacak şekilde sonlu elemanlar analizinde ayarlanmıştır. Başlangıç, 15, 30, 60, 90 ve 120 günlerde doku iskelelerinin rijitlik değerleri sonlu elemanlar analiziyle hesaplanmış olup sonuçları Şekil 3.8’de verilmiştir. Biyobozunma günü süresi arttıkça doku iskelelerinin rijitlik değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir. 120. güne kadar normalize edilmiş molekül ağırlık değeri hiçbir doku iskelesi elemanında eşik değerin altına düşmediği için kütleli (bulk) biyobozunma gözlemlenmemiştir. Şekil 3.9’daki sonuçlara göre doku iskeleleri 120 günün sonunda başlangıça göre rijitlik değerleri yaklaşık olarak %38 civarında azalma gözlemlenmiştir. Bu da doğrudan doku iskelelerinin aynı yük değeri altında toplam şekil değiştirme ve birim şekil değiştirme değerlerini arttırmaktadır. Periyodik doku iskelelerinin 4 N yük etkisi altında başlangıç durumundaki ve 120. gündeki Von Mises gerilme, toplam yer değiştirme ve birim şekil değiştirme dağılımları EK F’de verilmiştir. EK F’deki sonlu elemanlar analizi sonuçları incelendiği zaman 4 N’luk mekanik yük etkisi altında doku iskelelerinin farklı biyobozunma günlerinde Von Mises gerilme dağılımlarının değişmediği görülmüştür. Fakat toplam yer değiştirme ve birim şekil değiştirme değerlerinin artan biyobozunma günüyle birlikte arttığı tespit edilmiştir. Bunun temel sebebi doku iskelesi malzemesinin biyobozunma etkisi altında elastisite modülünün giderek azalmasıdır. Doku iskeleleri kritik birim şekil değiştirme değerlerine ulaştığı zaman hasara uğramaya başlayacaktır. En yüksek birim şekil değiştirme değerleri BCS doku iskelelerinde gözlemlenmiştir.

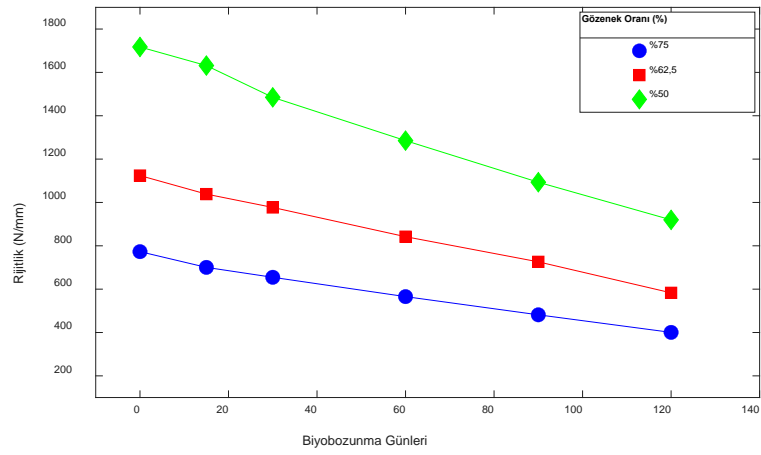
BC



BCS



BCC



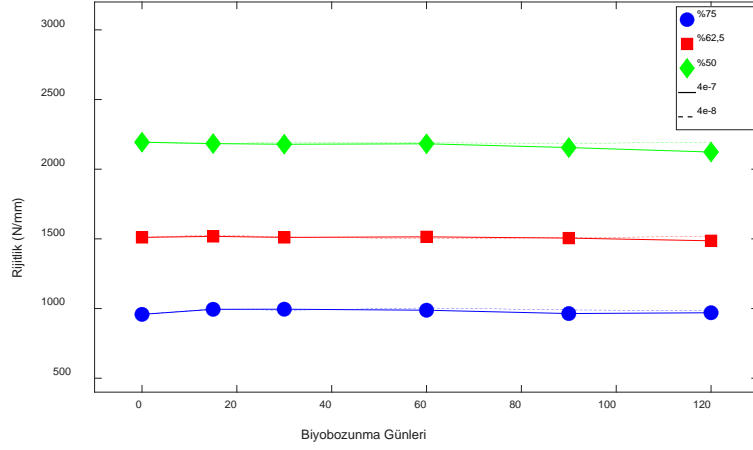
Şekil 3.8: Periyodik doku iskelelerinin birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinden elde edilen rijitlik değerleri.

3.4.2 Difüzyon esaslı biyobozunma modeli

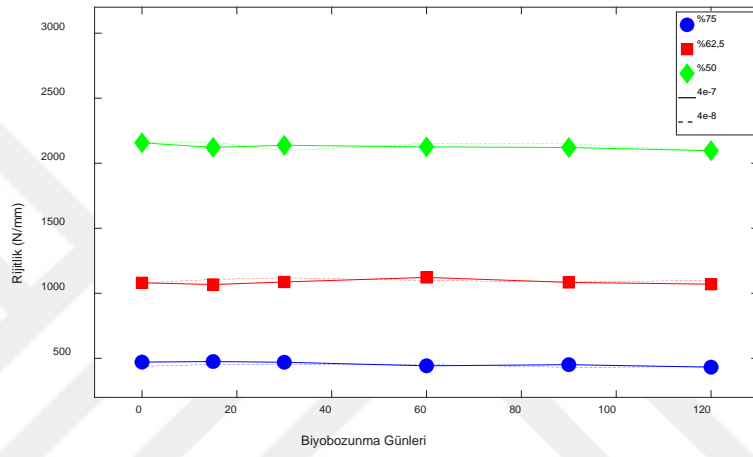
Difüzyon esaslı biyobozunma modelinde periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışı suyun konsantrasyonu ile ilişkilidir. Bu yaklaşımda suyun doku iskelesinin içerisine Denklem 2.6 'daki difüzyon denklemiyle difüze olduğu kabul edilmektedir. Suyun konsantrasyon değeri ise Denklem 2.6'daki gibi moleküler ağırlık ile ilişkilendirilmiştir. Moleküler ağırlık değeriyle elastisite modülü arasında Denklem 2.5'teki gibi lineer bir ilişki olduğu kabul edilmiştir. Difüzyon esaslı biyobozunma modelinde difüzyon katsayısı olarak 4×10^{-7} ve 4×10^{-8} değerleri seçilmiştir. Her iki difüzyon katsayısı için biyobozunma modeli MATLAB ortamında 120 gün boyunca çalıştırılmıştır. Buradan elde edilen elastisite modülü değerleri kullanılarak sonlu elemanlar analizi gerçekleştirilmiş ve periyodik doku iskelelerinin rijitlik değerleri hesaplanmıştır.

Şekil 3.9'da periyodik doku iskelelerinin difüzyon esaslı biyobozunma modelinden elde edilen rijitlik değerleri verilmiştir. Difüzyon katsayıları oldukça küçük seçildiği için 120. güne gelindiği zaman bile rijitlik değerlerinde düşüş gözlemlenmemiştir. EK G'de 120.günün sonundaki periyodik doku iskelelerindeki su konsantrasyonu, moleküler ağırlık ve elastisite modülü dağılımları 4×10^{-7} ve 4×10^{-8} difüzyon katsayıları için verilmiştir.

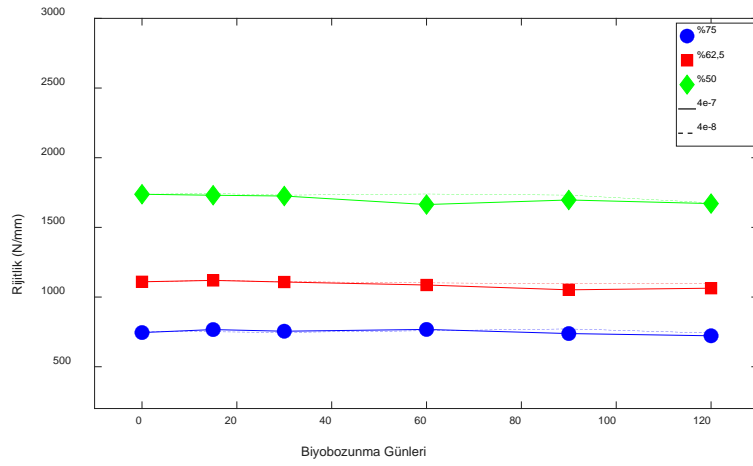
BC



BCS



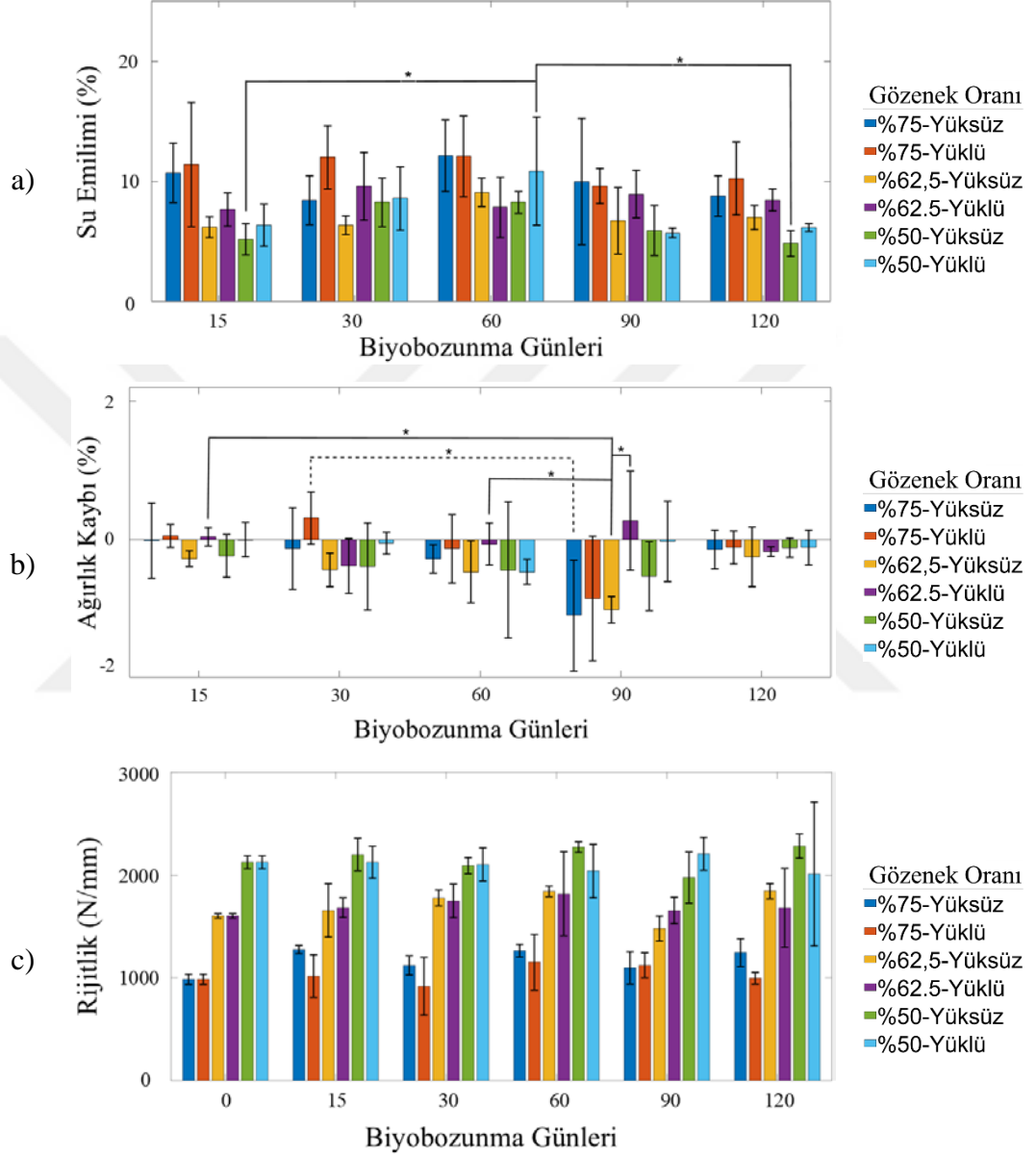
BCC



Şekil 3.9: Periyodik doku iskelelerinin difüzyon esaslı biyobozunma analizinden elde edilen rijitlik değerleri.

3.4.3 Biyobozunma deneyleri

BC, BCS ve BCC periyodik doku iskelelerinin 4 N'luk mekanik yük etkisi altında biyobozunma deneyleri 15, 30, 60, 90 ve 120 gün boyunca Bölüm 2.5.3'te anlatılan yöntemle gerçekleştirilmiş ve karakterize edilmiştir.

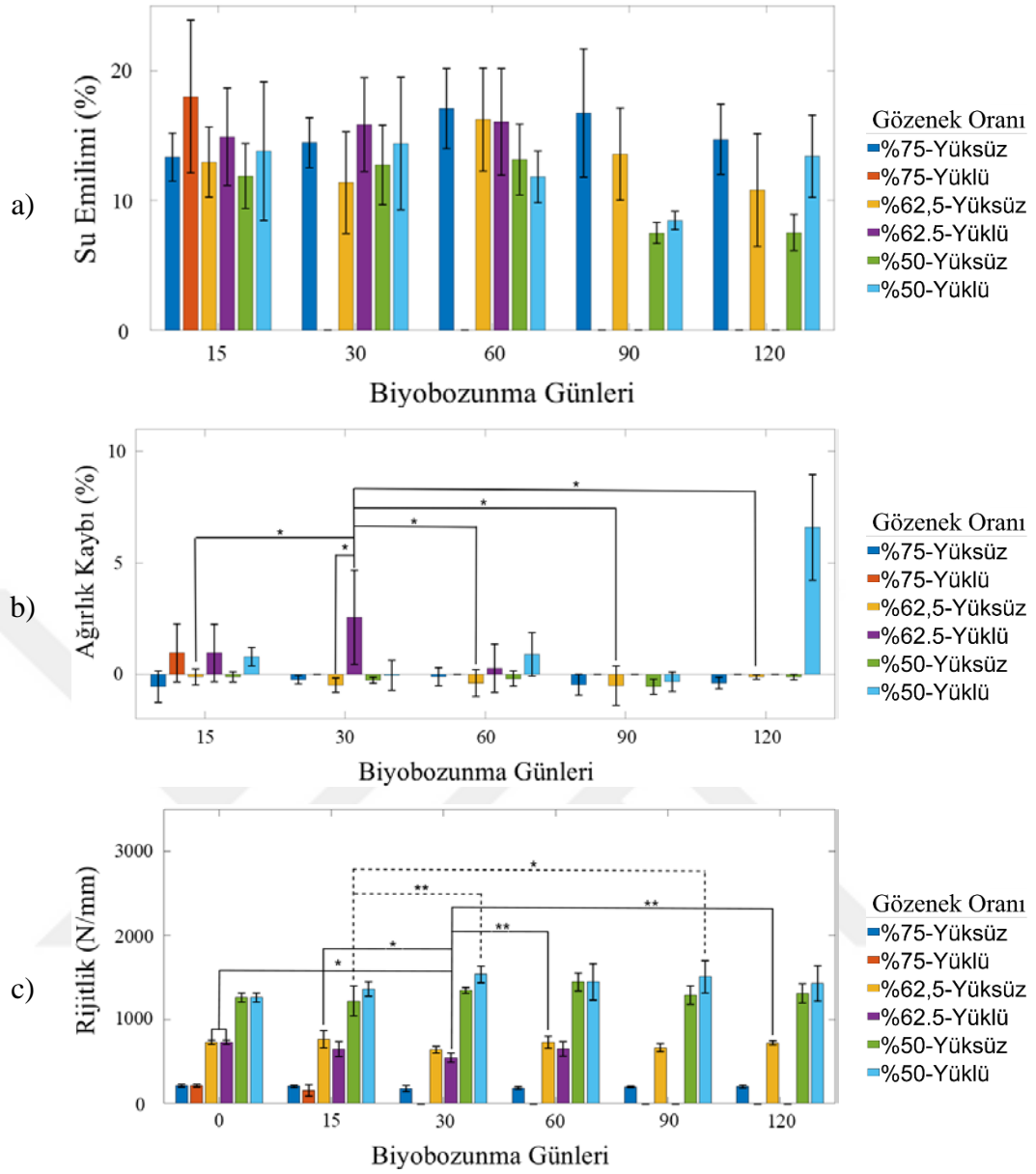


Şekil 3.10: Basit küp (BC) periyodik doku iskelesinin biyobozunma deney sonuçları a) su emilimi b) kütle kaybı c) rijitlik (* p<0,05).

Şekil 3.10'da BC periyodik doku iskelelerinin biyobozunma deneyinden elde edilen sonuçlar verilmiştir. BC periyodik doku iskelelerinin su emilimi Şekil 3.10a'da gösterilmektedir. Tüm biyobozunma günleri boyunca en yüksek su emilimi %75 gözenek oranına sahip doku iskelelerinde olduğu görülmektedir. Ayrıca, BC doku iskeleleri mekanik yüklemeye maruz kaldıklarında genellikle daha yüksek su emilim

değerlerine sahip olmuştur. En yüksek su emilimi 60. günde %75 gözenekli doku iskelesi için gerçekleşmiş olup yaklaşık %12'dir. Şekil 3.10b BC doku iskelelerinin ağırlık kaybı ölçümlerini göstermektedir. BC doku iskeleleri dalgalı bir davranış sergilemiş ve deney boyunca ağırlık kazanmıştır. En yüksek ağırlık artışı (yaklaşık %1,1) 90. günde %75 gözeneklilik oranında kaydedilmiştir. BC doku iskelesi için en yüksek ağırlık kaybı %62,5 gözeneklilik oranıyla yüklü numunede 90. günde gözlenmiştir. Fakat bu numune yüksek bir standart sapma gösterdiğinden anlamlı bir ağırlık kaybı olarak değerlendirilmemiştir. Şekil 3.10c'de, rijitlik değerlerindeki deneysel değişiklikler biyobozunma süresinin bir fonksiyonu olarak sunulmuştur ve rijitlik değerleri dalgalı bir davranış sergilemektedir. 15. günde, rijitlik değerleri tüm gözeneklilik oranları için yüksüz ve yüklü koşullar altında artmıştır. Bununla birlikte, 30. günde, rijitlik değerleri hem yüksüz hem de yüklü koşullar altında %50 ve %75 gözeneklilik oranları için azalırken, %62,5 gözeneklilik oranı için artmıştır. 60. günde, mekanik yükleme altında %50 gözeneklilik oranı hariç, rijitlik değerleri genel olarak artmıştır. 90. güne gelindiğinde, rijitlik değerleri %62,5 ve %50 porozite oranları için yüksüz koşullarda başlangıç değerlerinin altına düşmüştür. Ancak, mekanik yükleme altında bu değerler aynı %62,5 ve %50 porozite oranları için başlangıç değerlerinin ötesine geçmiştir. Benzer eğilimler yüksüz ve yüklü koşullar altında %75 gözeneklilik oranı için de gözlenmiştir. 120. günün sonunda, tüm gözeneklilik oranları için rijitlik değerlerinin yüksüz koşullarda artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Buna karşılık, mekanik yükleme altında rijitlik değerlerinde bir düşüş görülmüştür.

Şekil 3.11'de BCS periyodik doku iskelelerinin biyobozunma deneyinden elde edilen sonuçlar verilmiştir. Şekil 3.11a BCS doku iskelelerin su emilim değerlerini göstermektedir ve en yüksek su emme miktarlarının tüm biyobozunma günleri boyunca %75 gözeneklilik oranında olduğu görülmektedir. Maksimum su emilimi %75 gözenekli yüklenmiş numune için 15. günde gerçekleşmiştir ve bu değer yaklaşık %18'dir. BCS periyodik doku iskelelerinin ağırlık kaybı ölçümleri Şekil 3.11b'de gösterilmiştir. BCS periyodik doku iskeleleri dalgalı bir davranış sergilemiş ve biyobozunma gününe, gözenekliliğe ve yüklemeye bağlı olarak hem ağırlık kayıpları hem de kazançlar meydana gelmiştir. En yüksek ağırlık kaybı %6,59 civarındadır ve mekanik yükleme altında 120 gün sonra %50 gözeneklilik oranında gözlenmiştir. Şekil 3.11c yüksüz ve yüklü koşullar altında tüm biyobozunma günleri için rijitlik değerlerini göstermektedir.

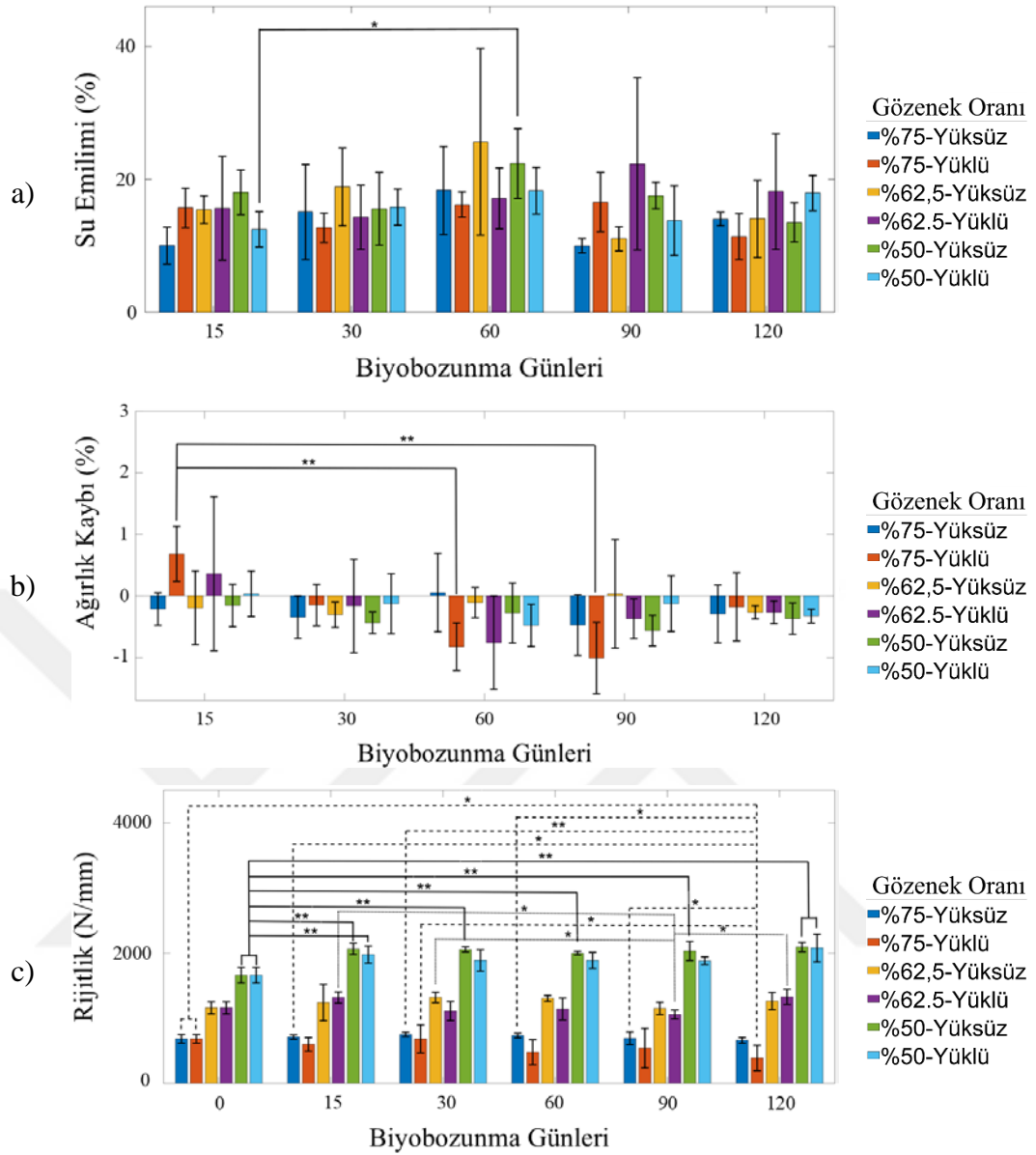


Şekil 3.11: Hacim merkezli yapı (BCS) periyodik doku iskelesinin biyobozunma deney sonuçları a) su emilimi b) kütle kaybı c) rijitlik (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

Benzer dalgalı davranış doku iskelelerinin rijitlik değerlerinde de görülmektedir. Başlangıçta, yüksüz koşulda %62,5 gözeneklilik oranı ve mekanik yükleme altında %50 gözeneklilik oranı dışında rijitlik değerleri düşmüştür. Biyobozunma deneyleri, %75 gözeneklilik oranına sahip yüklü BCS doku iskeleleri için 15 gün sonra hasar gözlemlenmesi nedeniyle durdurulmuştur. Ayrıca, yüksüz durumda %75 gözeneklilik oranına sahip BCS doku iskelesinin rijitlik değerleri tüm biyobozunma günleri boyunca sabit kalmıştır. %50 gözeneklilik oranına sahip BCS doku iskelesinin rijitlik değerlerinde 30. günde bir artış görülmüştür. Buna karşılık, %62,5 gözeneklilik oranına sahip doku iskelelerinin rijitlik değerlerinde bir düşüş göstermiştir. Bu

iskelelerde gözlenen hasarlar nedeniyle mekanik yükleme altında %62,5 gözeneklilik oranına sahip doku iskeleleri için bozunma testleri 60 gün sonra durdurulmuştur. 90. günde, rijitlik değerleri %50 gözenekli yüklü numuneler dışında genel olarak azalmıştır. Bununla birlikte, 120 günün sonunda, rijitlik değerlerinde bir düşüşün gözlemlendiği %50 gözeneklilik oranına sahip numuneler dışında, rijitlik değerleri genel bir artış sergilemiştir.

Şekil 3.12'de BCC periyodik doku iskelelerinin biyobozunma deneyinden elde edilen sonuçlar verilmiştir. Şekil 3.12a su emilim değerlerini göstermektedir ve en yüksek su emilimi neredeyse tüm doku iskeleleri için 60. günde gerçekleşmiştir ve %62,5 gözenekli yüksüz numune için maksimum değer %25'tir. Şekil 3.12b'de, BCC periyodik doku iskelelerinin ağırlık kaybı ölçümleri gösterilmektedir ve doku iskeleleri dalgalı bir davranış sergilemiş ve 120 gün boyunca su emilimine bağlı olarak çoğunlukla ağırlık kazanımı gerçekleşmiştir. Şekil 3.12c tüm biyobozunma günleri için doku iskelelerinin rijitlik değerlerindeki değişimleri göstermektedir. %75 gözeneklilik oranına sahip BCC doku iskelesinin rijitlik değerleri mekanik yükleme altında azalma eğilimi göstermiştir. Yüksüzken durumdayken %75 gözeneklilik oranına sahip BCC doku iskeleleri rijitlik açısından daha tutarlı bir davranış sergilemiştir. Öte yandan, %62,5 ve %50 gözenek oranına sahip BCC doku iskelelerinin rijitlik değerleri 15. günde artmıştır. Bu sürenin ardından, %50 gözeneklilik oranına sahip BCC iskeleleri 120. günün sonuna kadar yüksüz ve yüklü koşullar altında kararlı rijitlik davranışı sergilemiştir. Yüksüz durumda %62,5 porozite oranına sahip BCC doku iskeleleri, 90. gün hariç 30. günden sonra hemen hemen sabit rijitlik davranışı sergilemiştir.



Şekil 3.12: Hacim merkezli kübik (BCC) periyodik doku iskelesinin biyobozunma deney sonuçları a) su emilimi b) kütle kaybı c) rijitlik (* $p<0,05$, ** $p<0,005$).

3.5 In Vitro Analizler

3.5.1 PLA malzemesinin biyoyoumluluk analizleri

3.5.1.1 MTT yöntemiyle sitotoksitenin değerlendirilmesi

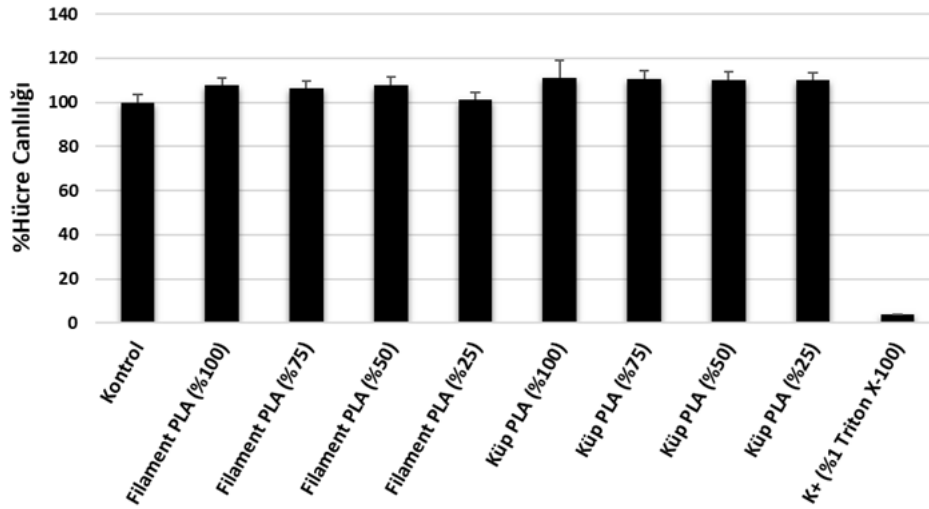
Sitotoksitenin belirlenmesi için küp ve filament formda üretilen PLA malzemelerinin RPMI 1640 besiyerinde hazırlanan ekstrakt çözeltileri 4 farklı konsantrasyonda (%100, %75, %50, %25) 96'lı hücre kültürü kaplarına ekilerek hücreler ile muamele edilmiştir. Ayrıca kıyaslama için herhangi bir kimyasal madde içermeyen negatif kontrol grubu ve Triton x-100 içeren pozitif kontrol grubu hazırlanmıştır. 96'lı hücre

kültürü kaplarında her bir örnek 8 kuyu tekrarlı olarak ayrıca tüm deneyler ayrı zamanlarda iki tekrarlı olarak çalışılmıştır. Elde edilen tüm verilerin ortalamaları alınarak yaşayan hücrelerin ortalama absorbans değerleri ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 kabul edilerek tüm örnekler için kontrole kıyasla yaşayan hücre yüzdeleri belirlenmiştir. MTT testi ile belirlenen yaşayan hücre ortalama absorbans değerleri ve yaşayan hücre yüzdeleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: MTT yöntemine göre pla malzemelerinin L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.

Örnek	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
Kontrol	2,232±0,147	100 ±3,42
Filament PLA (%100)	2,401±0,081	107,54±3,62
Filament PLA (%75)	2,371±0,080	106,21±3,64
Filament PLA (%50)	2,401±0,080	107,80±3,63
Filament PLA (%25)	2,259±0,076	101,12±3,42
Küp PLA (%100)	2,478±0,181	110,99±8,15
Küp PLA (%75)	2,469±0,078	110,58±3,51
Küp PLA (%50)	2,457±0,084	110,05±3,76
Küp PLA (%25)	2,462±0,074	110,27±3,32
K+ (%1 Triton X-100)	0,086±0,003	3,86±0,14

L929 hücrelerinde 24 saatlik kimyasal muamelesi ardından uygulanan MTT testi sonuçlarına göre PLA ile muamele edilen gruplar negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda hücre canlılığında artış olduğu görülmüştür. MTT testi sonuçlarına göre PLA herhangi bir sitotoksik etki oluşturmamakta hatta hücre proliferasyonunda artışa neden olmaktadır. Şekil 3.13’te MTT testinden elde edilen hücre canlılığı sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.13: MTT testinden elde edilen hücre canlılık sonuçları.

3.5.2 NKA yöntemiyle sitotoksitenin değerlendirilmesi

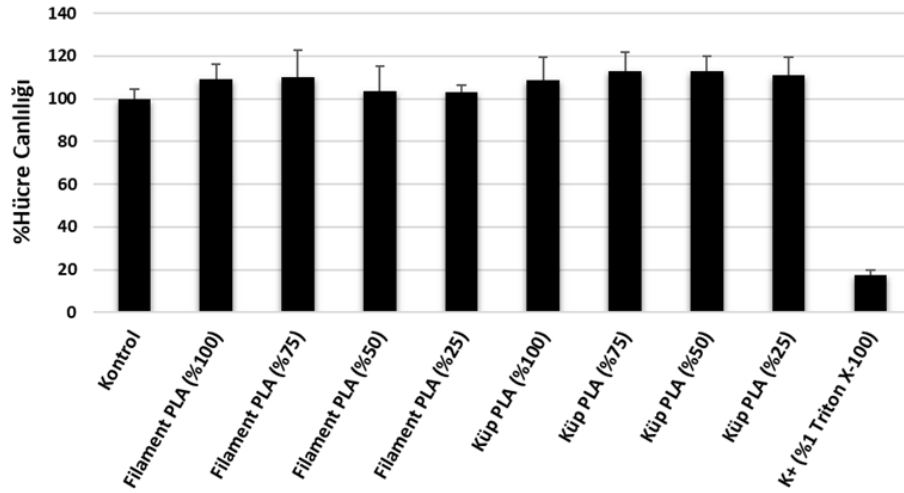
Sitotoksitenin belirlenmesi için küp ve filament formda üretilen PLA doku iskelelerinin RPMI 1640 besiyerinde hazırlanan ekstrakt çözeltileri 4 farklı konsantrasyonda (%100, %75, %50, %25) 96'lı hücre kültürü kaplarına ekilerek hücreler ile muamele edilmiştir.

Çizelge 3.3: NKA yöntemine göre pla malzemelerinin L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.

Örnek	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
Kontrol	1,030±0,044	100±4,35
Filament PLA (%100)	1,123±0,072	109,08±6,95
Filament PLA (%75)	1,132±0,133	109,89±12,90
Filament PLA (%50)	1,065±0,068	103,38±11,88
Filament PLA (%25)	1,062±0,122	103,11±3,42
Küp PLA (%100)	1,119±0,112	108,57±10,89
Küp PLA (%75)	1,163±0,093	112,84±8,99
Küp PLA (%50)	1,162±0,074	112,77±7,22
Küp PLA (%25)	1,142±0,088	110,88±8,58
K+ (%1 Triton X-100)	0,182±0,023	17,62±2,24

Ayrıca kıyaslama için herhangi bir kimyasal madde içermeyen negatif kontrol grubu ve Triton x-100 içeren pozitif kontrol grubu hazırlanmıştır. 96'lı hücre kültürü kaplarında her bir örnek 8 kuyu tekrarlı olarak çalışılmıştır. Elde edilen tüm verilerin

ortalamaları alınarak yaşayan hücrelerin ortalama absorbans değerleri ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 kabul edilerek tüm örnekler için kontrole kıyasla yaşayan hücre yüzdeleri belirlenmiştir. NKA testi ile belirlenen yaşayan hücre ortalama absorbans değerleri ve yaşayan hücre yüzdeleri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. L929 hücrelerinde 24 saatlik kimyasal muamelesi ardından uygulanan NKA testi sonuçlarına göre PLA ile muamele edilen gruplar negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda hücre canlılığında artış olduğu görülmüştür. NKA testi sonuçlarına göre PLA malzemesi herhangi bir sitotoksik etki oluşturmamakta hatta hücre proliferasyonunda az miktarda artışa neden olmaktadır. Şekil 3.14'te NKA testinden elde edilen hücre canlılığı sonuçları verilmiştir.

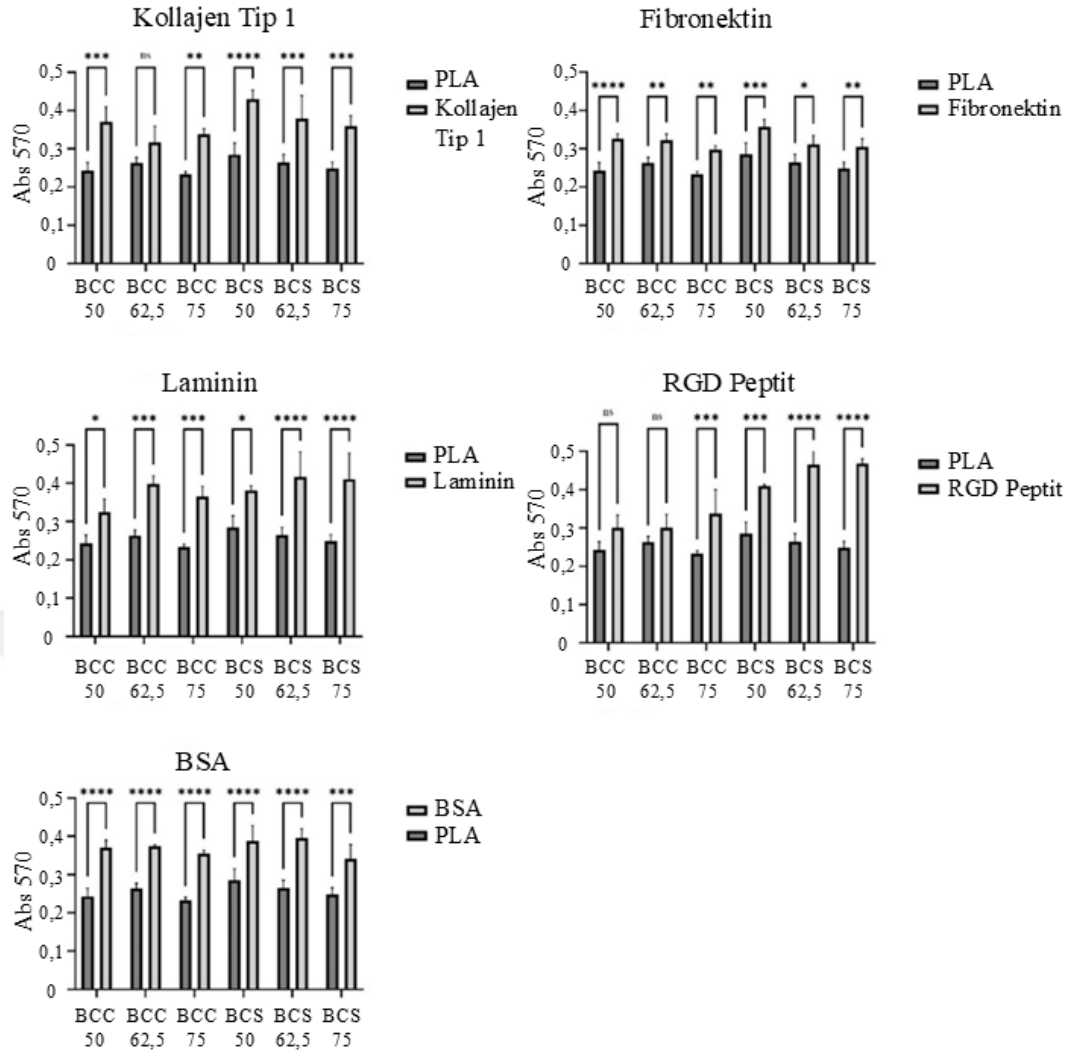


Şekil 3.14: NKA testinden elde edilen hücre canlılık sonuçları.

3.5.3 Periyodik doku iskelelerinin yüzey modifikasyonunun değerlendirilmesi

3.5.3.1 MTT canlılık analiziyle yüzey modifikasyonlarının belirlenmesi

BCS ve BCC gözenek geometrilerine ve %50, %62,5 ve %75 gözenek oranlarına sahip doku iskeleleri Çizelge 2.6'da belirtilen 5 farklı kaplama malzemesiyle kaplandıktan ve hFOB 1.19 hücreleri ekildikten sonra MTT yöntemiyle canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

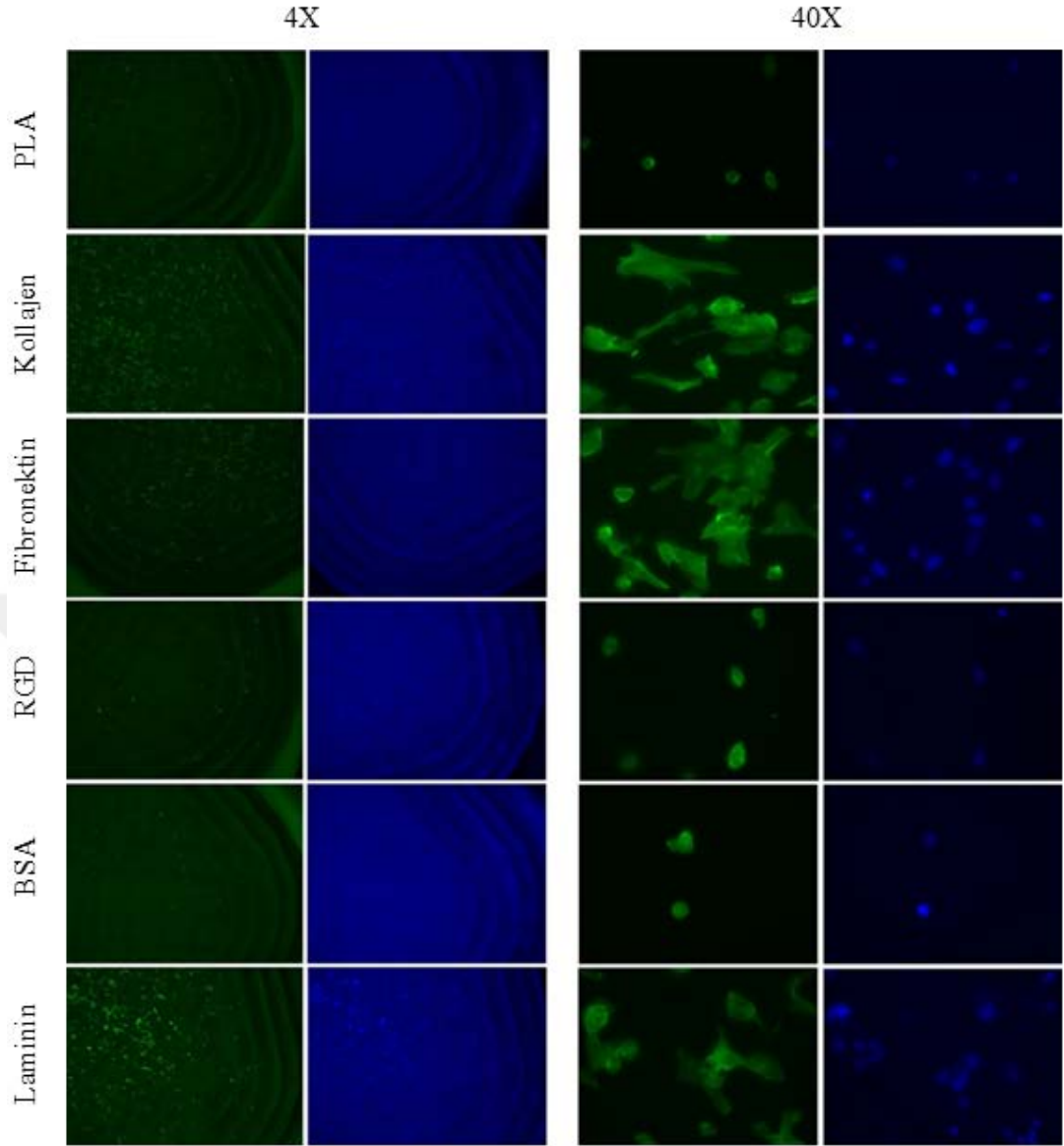


Şekil 3.15: Farklı kaplama malzemeleriyle kaplanmış periyodik doku iskelelerinin MTT canlılık analizi sonuçları (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, ****p < 0.0001 ve ns;nonsignificant).

Bu amaçla 5 mg/ml MTT stok solüsyonu PBS, pH 7.2 içinde hazırlanıp filtre edilmiştir. Ardından 48 saat hücrelerle inkübe edilmiş iskelelerin üzerine MTT solüsyonu eklenmiş ve 4 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Bu süreçte doku iskeleleri üzerinde mavi-mor formazan kristallerin oluşması mikroskopla gözlemlenmiştir. MTT solüsyonu sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur, ortamda canlı olup proliferen olan hücreler hücre içindeki mitokondriyel dehidrojenaz enzimin aktivitesi ile bu kimyasal mor renkli formazan kristallerine dönüştürür [87]. Daha sonra solubilizasyon tampon çözeltisi (0.01 N HCL içinde çözünmüş %10 sodyum dodesil sülfat) eklenerek gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücre canlılığı 570 nm’de absorbansları okunarak tayin edilmiştir. Şekil 3.15’te MTT canlılık analizinden elde edilen sonuçlar verilmiştir. Bu sonuçlara göre kullanılan tüm periyodik doku iskelelerinde kaplamasız doku iskelelerine göre hücre canlılığında artış olduğu görülmüştür.

3.5.3.2 PLA malzemesi üzerindeki farklı kaplama malzemelerinin hücre morfolojisi üzerine etkileri

Farklı yüzey modifikasyon malzemeleriyle (Kollajen Tip 1, Fibronektin, RGD Peptit, BSA ve Laminin) kaplanmış olan PLA plakalar üzerindeki hFOB 1,19 hücrelerinin morfolojileri floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. Elde edilen floresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.16'da verilmiştir. Burada aktin filamentler yeşil (Phalloidin 488-FITC) ve hücre çekirdekleri mavi (Hoechst 33342) olarak 4X ve 40X büyütmede görülmektedir. Floresan mikroskop görüntülerine bakıldığı zaman hFOB 1.19 hücreleri kaplamasız PLA malzeme üzerinde hiçbir şekilde yayılım göstermemiştir. Ayrıca RGD Peptit ve BSA kaplama malzemeleriyle kaplanmış PLA malzeme üzerinde de benzer şekilde hFOB 1.19 hücreleri yayılım göstermemişlerdir. En iyi sonuçlar Kollajen, Fibronektin ve Laminin kaplama malzemelerinden elde edilmiştir. Bundan dolayı in vitro analizlerin devamında Kollajen Tip 1 kaplama malzemesi kullanılmıştır.

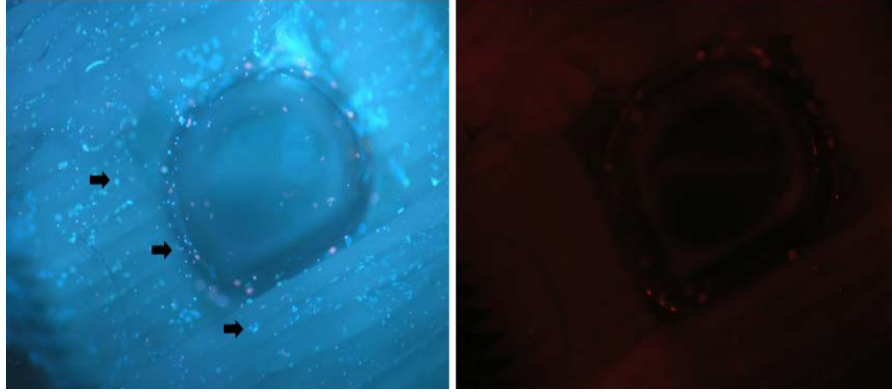


Şekil 3.16: Yüzey modifikasyon malzemeleri (kollajen tip1, fibronektin, RGD peptit, BSA ve laminin) ile kaplanmış PLA plakalar üzerindeki hFOB 1.19 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.

3.5.4 Hücre Canlılık Analizleri

Periyodik doku iskeleleri üzerinde hFOB 1.19 osteoblast hücrelerinin tutunabildiğini göstermek amacıyla ikili floresan boyaması yapılmıştır. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabilen boyalar olup hücre çekirdeğinin ve kromatindeki değişikliklerin görüntülenebilmesi için kullanılırlar. Hoechst 33342 (mavi) bu boyalardan olup canlı/ölü (apoptotik/nekrotik) bütün hücrelerin çekirdeklerini boyamaktadır. Propidyum iyodür (PI)(kırmızı) ise yine bir DNA boyasıdır ancak sadece membranı hasar görmüş, ölü hücrelerden içeri girerek boyama gerçekleştirir. Şekil 3.17'de görüldüğü üzere Kollajen Tip 1 ile kaplanmış periyodik doku iskeleleri üzerinde canlı

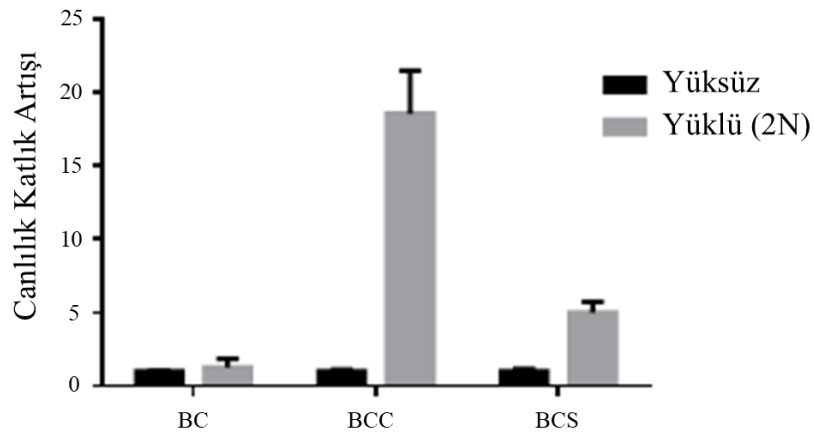
hFOB 1.19 hücrelerinin tutunduğu ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin canlı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.17: Periyodik doku iskelesi üzerine ekilmiş hFOB 1.19 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.

Siyah oklarla belirtilen her bir nokta canlı hFOB 1.19 hücrelerini göstermektedir. Propidyüm iyodür ile boyanmış doku iskelesi üzerindeki hücre popülasyonunda ölü hücrelere rastlanmamıştır.

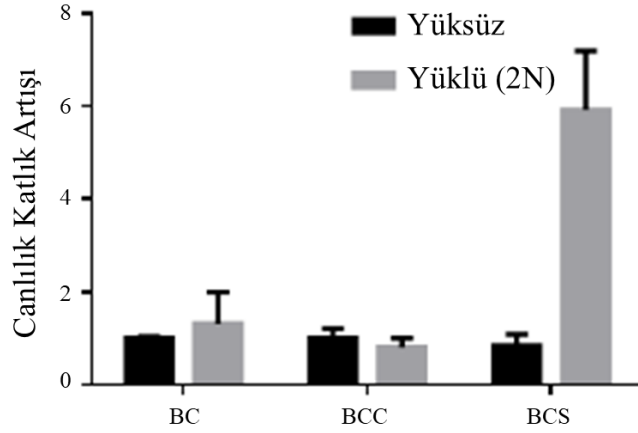
Uygulanan 2 N'luk mekanik yükün periyodik doku iskeleleri üzerindeki canlılığa etkisini incelemek için yük uygulanmayan hFOB 1.19 hücreleri ekilmiş periyodik doku iskeleleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Daha sonra uygulanan mekanik yükün iki farklı gözenek oranına (%50-%75) sahip periyodik doku iskeleleri üzerinde 48 saat boyunca günde 1 kez 30 dakika ve 2N uygulanan yük ile yük uygulanmayan kontrol grubu arasında üç ayrı geometrideki (BC, BCC ve BCS) hücre canlılığına etkisi Şekil 3.18 ve Şekil 3.19'da verilmiştir.



Şekil 3.18: %50 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin canlılık analizi sonucu.

%50 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinde BCC doku iskelesinde uygulanan mekanik yükün canlılık artışı üzerine etkisi diğer doku iskelelerindeki

canlılık artışına kıyasla daha belirgindir. BC periyodik doku iskelesinde mekanik yükün canlılık artışı üzerine etkisinin olmadığı görülmektedir.



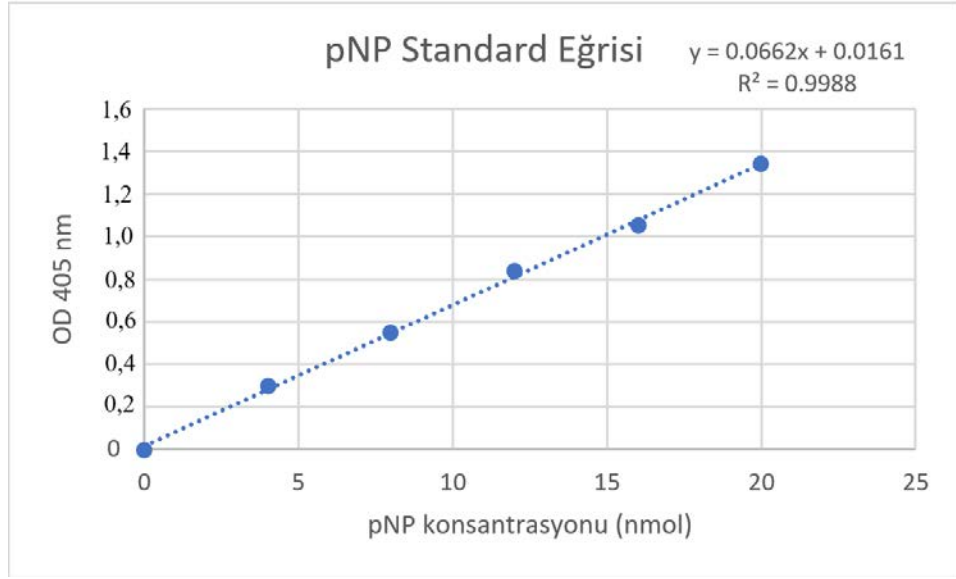
Şekil 3.19: %75 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin canlılık analizi sonucu.

Aynı koşullar altında sadece gözenek oranının değiştirilmesiyle bu sefer uygulanan mekanik yükün canlılık artışı üzerine etkisi en çok BCS periyodik doku iskelesinde görülmüştür. Diğer periyodik doku iskelelerinde uygulanan mekanik yükün kontrol grubuna göre canlılık artışına kayda değer bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Her iki gözenek oranının sonuçları incelendiğinde özellikle BC periyodik doku iskelesinde uygulanan mekanik yükün canlılık artışı üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür.

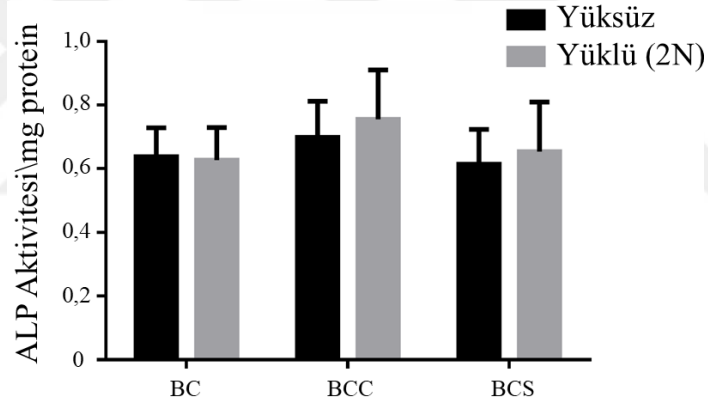
3.5.5 Alkalen fosfataz enzim (ALP) aktivitesi

Alkalen fosfataz enzimi alkali ortamda fosfat esterlerinin hidrolizini gerçekleştirir ve kemik oluşumunda önemli bir erken belirteçdir. Farklı gözenek oranı ve geometrisine sahip periyodik doku iskelelerinde mekanik yük uygulanmasının Alkalen fosfataz (ALP) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Öncelikle kit içerisinde bulunan ALP enzimi kullanılarak bilinen farklı dozlardaki pNPP substratının standard eğrisi Şekil 3.20'deki gibi oluşturulmuştur. Daha sonra Bölüm 2.6.8'de ifade edildiği üzere 7 gün boyunca günde 30 dakika 2 N mekanik yük uygulanmıştır. Yüklü ve yüksüz durumdaki periyodik doku iskelelerindeki hücrelerin ALP aktivitesi hesaplanmış ve aynı örneklerden alınan total protein miktarına oranlanarak normalizasyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.20: Alkalen fosfataz enzim aktivitesi standard eğrisi grafiği.

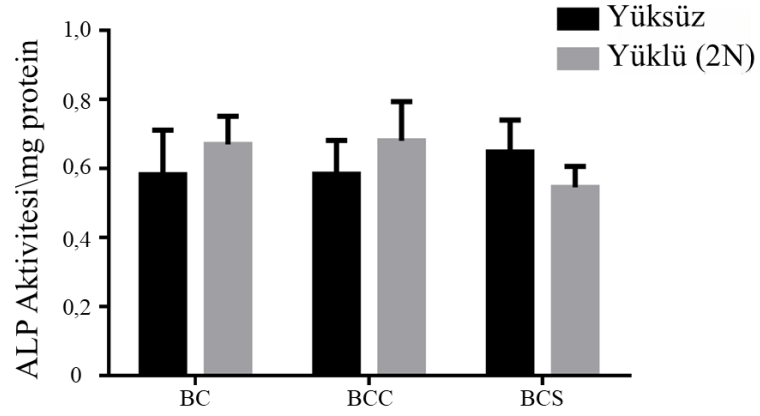
Şekil 3.21’de %50 gözenek oranına sahip doku iskelelerinin Alkalen fosfataz enzim aktivitesi analizi sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.21: %50 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin ALP enzim aktivitesi sonuçları.

Şekil 3.22’de de %75 gözenek geometrisine sahip periyodik doku iskelelerinin Alkalen fosfataz enzim aktivitesi sonuçları verilmiştir.

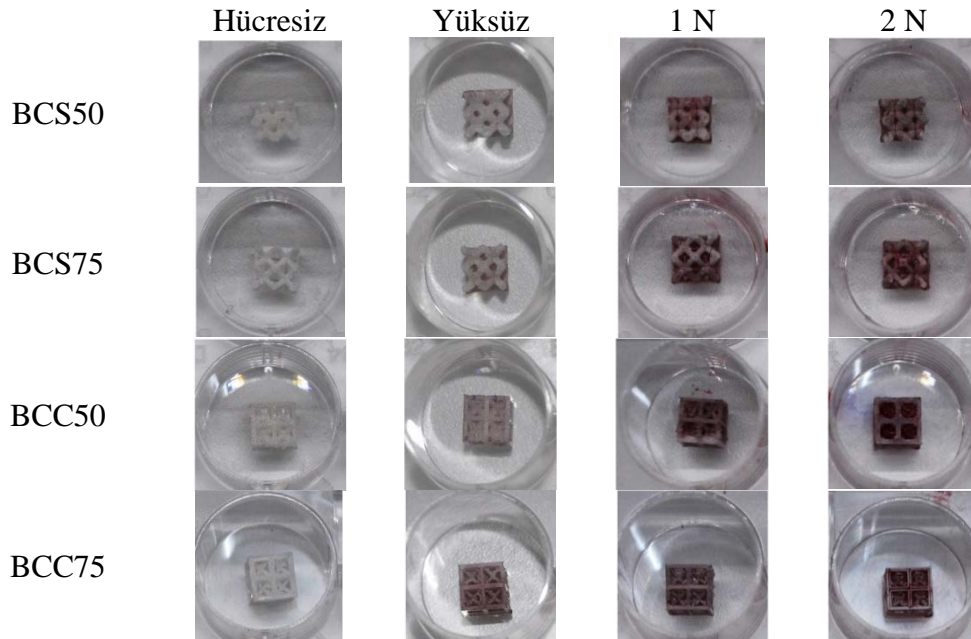
Her iki gözeneklilik oranında da BC, BCS ve BCC periyodik doku iskelelerinde mekanik yükün etkisinin Alkalen fosfataz enzim aktivitesi sonuçlarında önemli bir artış veya azalışa neden olmadığı görülmüştür.



Şekil 3.22: %75 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin ALP enzim aktivitesi sonuçları.

3.5.6 Mineralizasyon analizi

Mineralizasyon analizi Bölüm 2.6.10’da anlatıldığı gibi %50 ve %75 gözenek oranına sahip BCS ve BCC periyodik doku iskelelerinde 21 gün boyunca günde 30 dakika olmak üzere 1 N ve 2 N mekanik yük uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre bütün gruplarda mekanik yük uygulanmayan periyodik doku iskeleleri üzerindeki hFOB1.19 sağlıklı osteoblast hücrelerinin 21 günlük osteojenik farklılaşma ortamında oluşturdukları kalsiyum depozitleri kontrol grupları olarak belirlenmiştir. Mekanik yük etkisi altında periyodik doku iskeleleri üzerinde mineral oluşumunun Alizarin Kırmızısı S boyası ile boyandıktan sonra inverted mikroskoptan alınan görüntüleri Şekil 3.23’te verilmiştir.



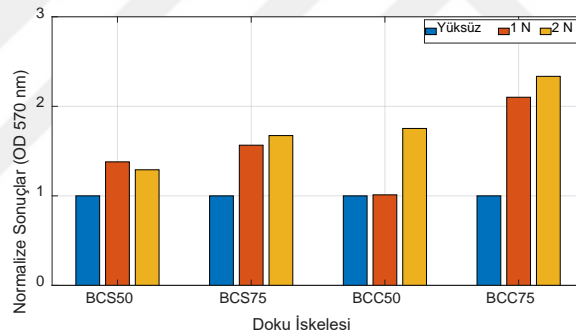
Şekil 3.23: Mineral oluşumu sonrası alizarin kırmızısı s boyası ile boyanmış periyodik doku iskeleleri.

Kantitatif kalsiyum değerlerinin hesaplamak için Bölüm 2.6.10'da anlatıldığı gibi periyodik doku iskelelerinden mineral ekstraksiyonları çıkarılmıştır. Daha sonra bu ekstrasyonların süpernatant absorbansları 570 nm'de microplate reader ile ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4: Mineralizasyon sonrası periyodik doku iskelelerinin OD 570 nm sonuçları.

	Yüksüz	1 N	2 N
BCS50	0,5924	0,8175	0,765
BCS75	0,5125	0,8025	0,8575
BCC50	0,6675	0,675	1,17
BCC75	0,53	1,11375	1,2375

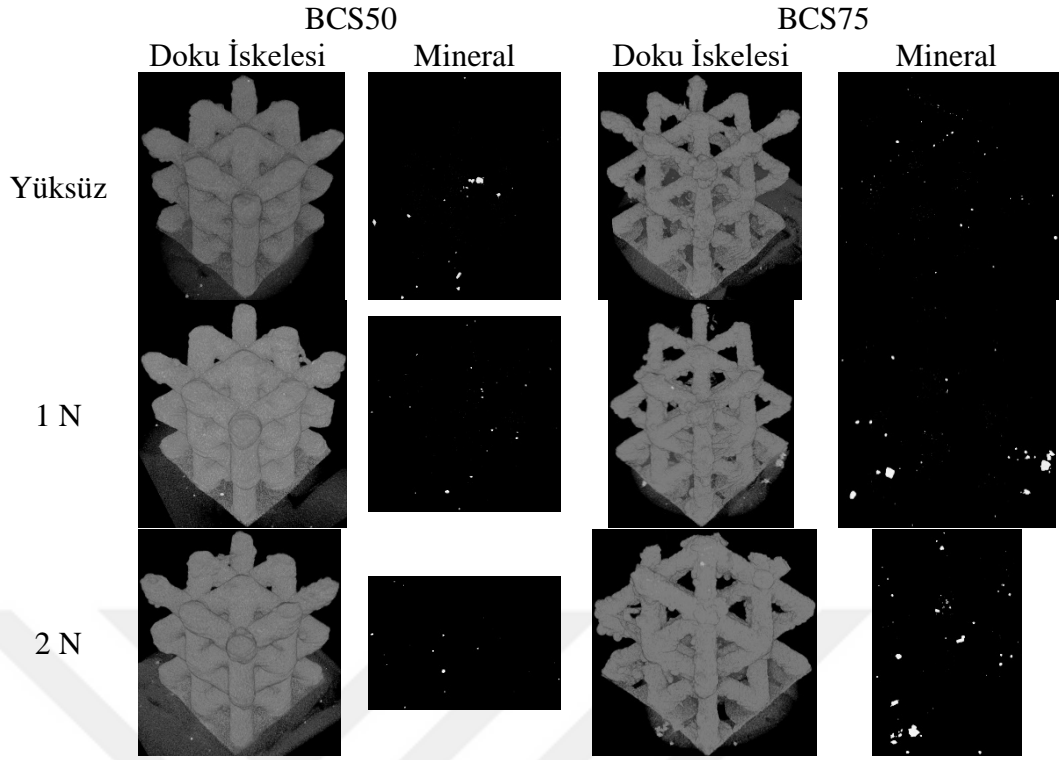
Mineralizasyon analizi sonrası elde edilen OD 570 nm sonuçları kontrol grubu olan yüksüz doku iskelelerinin sonuçlarına göre normalize edilmiştir. Böylelikle in silico analizden elde edilen sonuçlarla kıyaslanabilecektir. Şekil 3.24'te mekanik uyarı etkisi altındaki doku iskelelerinin normalize edilmiş sonuçlarının grafiği verilmiştir.



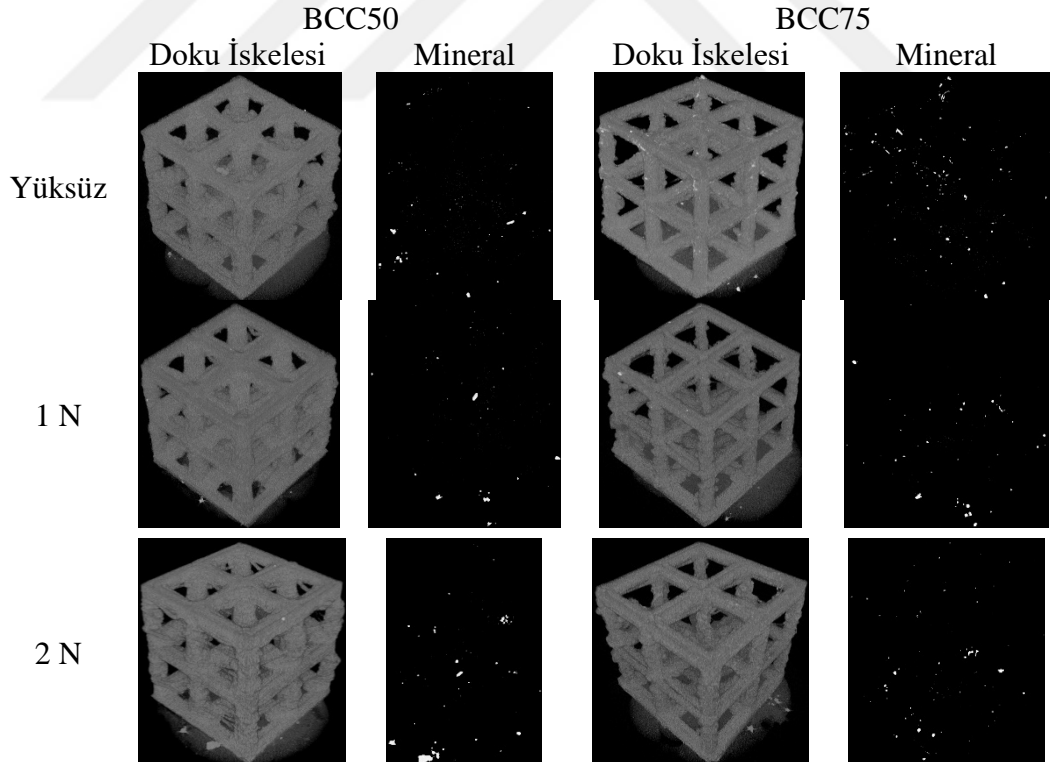
Şekil 3.24: Mineralizasyon analizi sonrası doku iskelelerinin normalize edilmiş sonuçları.

3.5.7 Mikro-BT analizi

Mikro-BT analizinde %50 ve %75 gözenek oranına sahip BCS ve BCC periyodik doku iskeleleri kullanılmıştır. Bu analizler için periyodik doku iskeleleri osteojenik farklılaşma ortamına alındıktan sonra 21 gün boyunca günde 30 dakika olmak üzere 1 N ve 2 N'luk mekanik yüklere maruz bırakılmıştır. 21 günün sonunda doku iskeleleri 1x PBS ile yıkandıktan sonra %10'luk formalin ile fiksasyon yapılarak mikro-BT analizi için hazır hale getirilmiştir. Mikro-BT taramalarında kontrol grubu olarak mekanik yük uygulanmamış periyodik doku iskeleleri kullanılmıştır. Mikro-BT taramalarından periyodik doku iskelelerinin görüntüleri ve sadece doku iskeleleri üzerindeki hFOB 1.19 hücrelerinin üretmiş olduğu mineral görüntüleri elde edilmiştir. Mikro-BT taramalarından elde edilen görüntüler Şekil 3.25 ve 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.25: BCS periyodik doku iskelesinin mikro-BT taramasından elde edilen görüntüler.



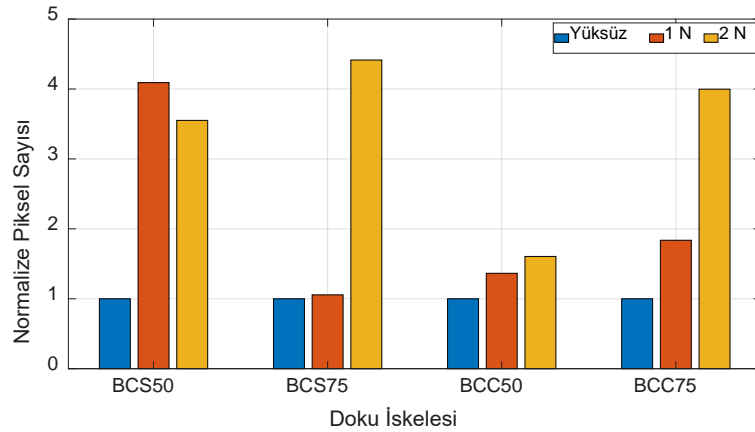
Şekil 3.26: BCC periyodik doku iskelesinin mikro-BT taramasından elde edilen görüntüler.

Mekanik yük etkisi altında BCS ve BCC geometrili doku iskelelerindeki hFOB 1.19 hücrelerinin ürettiği mineral miktarlarını birbirleriyle kıyaslayabilmek için MATLAB yazılımındaki görüntü işleme aracı kullanılmıştır. Minerallerin olduğu fotoğraflar öncelikle binary formatına çevrilmiştir. Bu formatta beyaz pikseller 1 değerini siyah pikseller ise 0 değerini almaktadır. Böylelikle beyaz piksellerin sayısı tespit edilerek mikro-BT tarama sonuçları birbiriyle kıyaslanabilir hale getirilmiştir. Şekil 3.25 ve Şekil 3.26'daki mikro-BT taramasından elde edilen mineral görüntülerindeki beyaz piksellerin sayısı Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5: Mineral resimlerdeki beyaz piksellerin sayısı.

	Yüksüz	1 N	2 N
BCS50	822	3363	2919
BCS75	4803	5073	21201
BCC50	2964	4044	4758
BCC75	3528	6480	14103

Görüntü işleme yönteminden elde edilen mineralleri temsil eden beyaz piksellerin sayısı kontrol grubu olarak düşünülen yüksük durumdaki piksellerin sayısına göre normalize edilmiştir. Normalize edilmiş sonuçlar in silico analizden elde edilen sonuçlarla kıyaslanabilecektir. Şekil 3.27'de normalize edilmiş sonuçların grafiği verilmiştir.



Şekil 3.27: Periyodik doku iskelelerinin normalize piksel sayıları.

3.6 In Silico Analiz

Bu kısımda in silico modelde periyodik doku iskelelerinin kemik yapılanma modelleri kullanılarak kemik dokusunun gelişimi simüle edilmiştir. Mikro-BT ve minerilizasyon analizleri 21 gün sonunda yapıldığı için in silico model de 21 çevrim

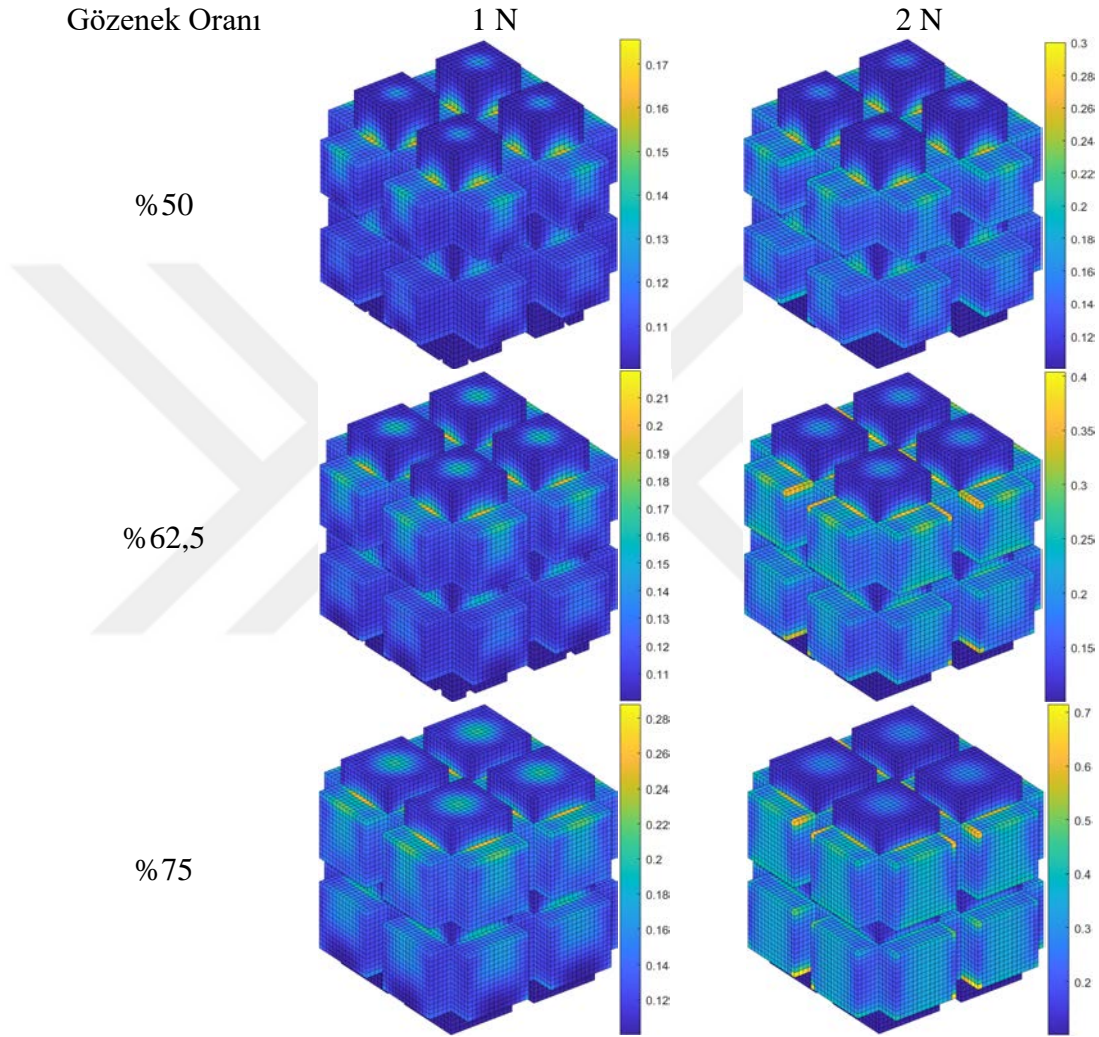
olarak çalıştırılmıştır. In silico modeldeki her çevrim 1 güne karşılık gelmektedir. In silico modelde in vitro analizlerde olduğu gibi mekanik yük olarak 1 N ve 2 N yükler her çevrimde 30 dakika uygulanacak şekilde tanımlanmıştır.

Çizelge 3.6: In silico modelde kullanılan katsayılar [65, 85].

Doku İskelesi Malzemesinin Elastisite Modülü (MPa)	1350
Doku İskelesi Malzemesinin Poisson Oranı	0,3
Sıvının Elastisite Modülü (MPa)	1
Sıvının Poisson Oranı	0,49
Kemik Dokusunun Poisson Oranı	0,3
Sabit (B) $((g\ cm^{-3})^2(MPa\ x\ time\ unit)^{-1})$	25000
Mekanik Uyarı Eşik Değeri (k) (J/g)	4×10^{-10}
Sabit (C) $(MPa(gcm^3)^{-3})$	3790
Başlangıç Kemik Dokusu Yoğunluğu (g/cm^3)	0,1

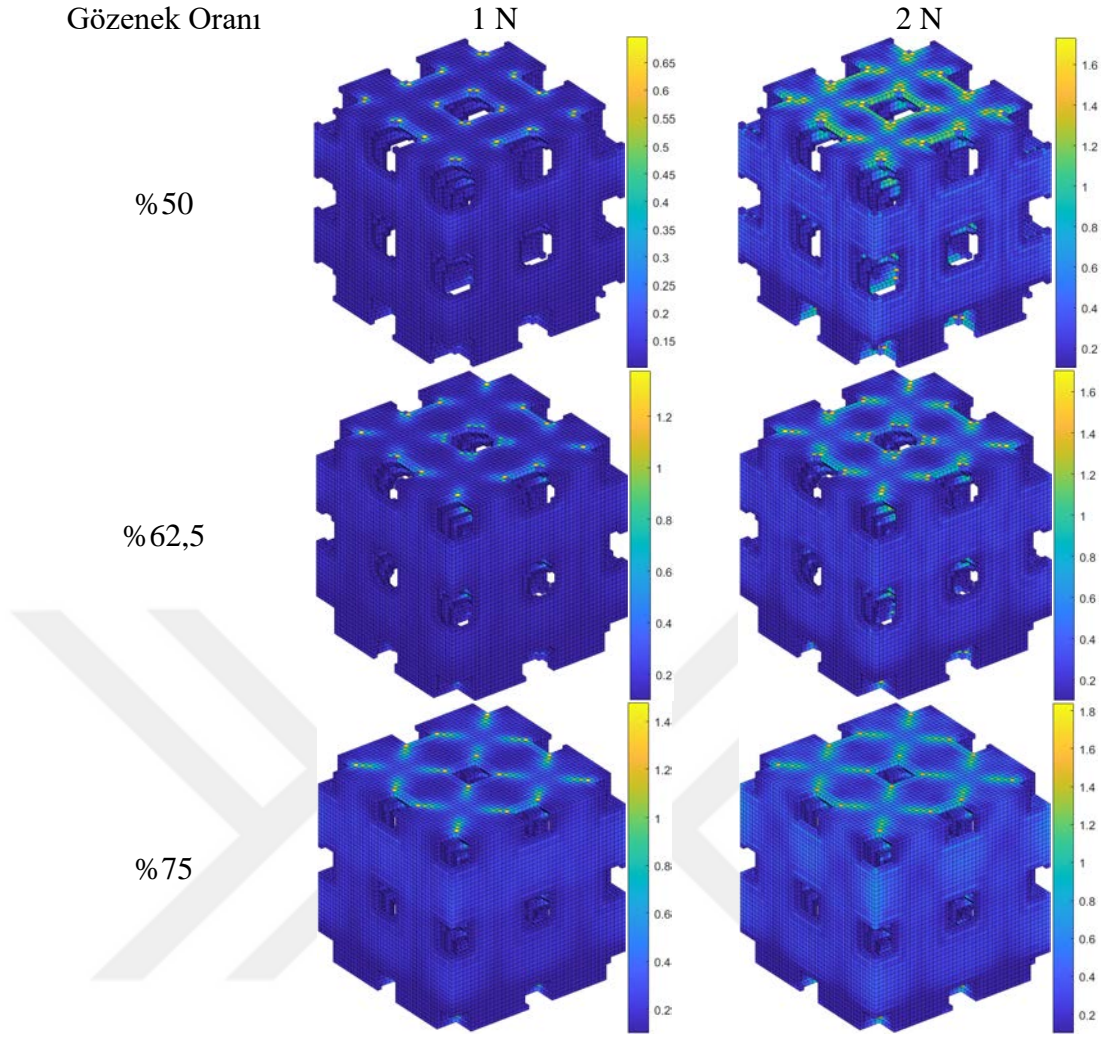
In silico modelde Denklem 2.16'da verilen matematiksel model kullanılmıştır. Bu matematiksel modele göre eğer mekanik uyarı seviyesi eşik değerin üzerindeyse kemik yapımı altındaysa kemik yıkımı gerçekleşecektir. Kullanılan bu model aslında hali hazırda uyluk kemiğindeki kemik yoğunluğunun mekanik uyarıya göre değişimini veren bir modeldir. Doku iskelesi uygulamasında kullanmak için bu modelin kullanımı değiştirilmiştir. Değiştirilen modelde parçalı bir fonksiyon tanımlanmıştır. Eğer mekanik uyarı eşik değerin üzerindeyse Denklem 2.16'da verilen matematiksel model aynı şekilde çalışacaktır. Fakat mekanik uyarı eşik değerin altındaysa Denklem 2.16 çalışmayacak ve kemik yoğunluğu sabit kalacaktır. Burada yapılan kabul mikro-BT ve mineralizasyon analizlerinin sonuçlarıyla da uyumludur. Çünkü kontrol grubu olarak kullanılan mekanik uyarı uygulanmamış doku iskelelerinde de mineral üretimi olduğu görülmüştür. Ayrıca mikro-BT ve mineralizasyon analizlerinin normalize edilmiş sonuçları kullanılarak bir dizi parametrik in silico analizler gerçekleştirilmiş olup kemik yapılanma modelindeki katsayılar belirlenmiştir. Çizelge 3.6'da in silico modelde kullanılan katsayılar verilmiştir.

Çizelge 3.6’da verilen katsayılar kullanılarak 21 gün boyunca günde 30 dakika 1 N ve 2 N mekanik yük altında periyodik doku iskelelerinin kemik yeniden yapılanma simülasyonları gerçekleştirilmiştir. In silico simülasyonlardan kemik dokusunun yoğunluk dağılımı elde edilmiştir. Şekil 3.28-3.30’da in silico simülasyondan elde edilen BC, BCS ve BCC periyodik doku iskelelerindeki kemik yoğunluk dağılımları verilmiştir.



Şekil 3.28: In silico modelden elde edilen BC doku iskeleleri üzerindeki kemik yoğunluk dağılımları.

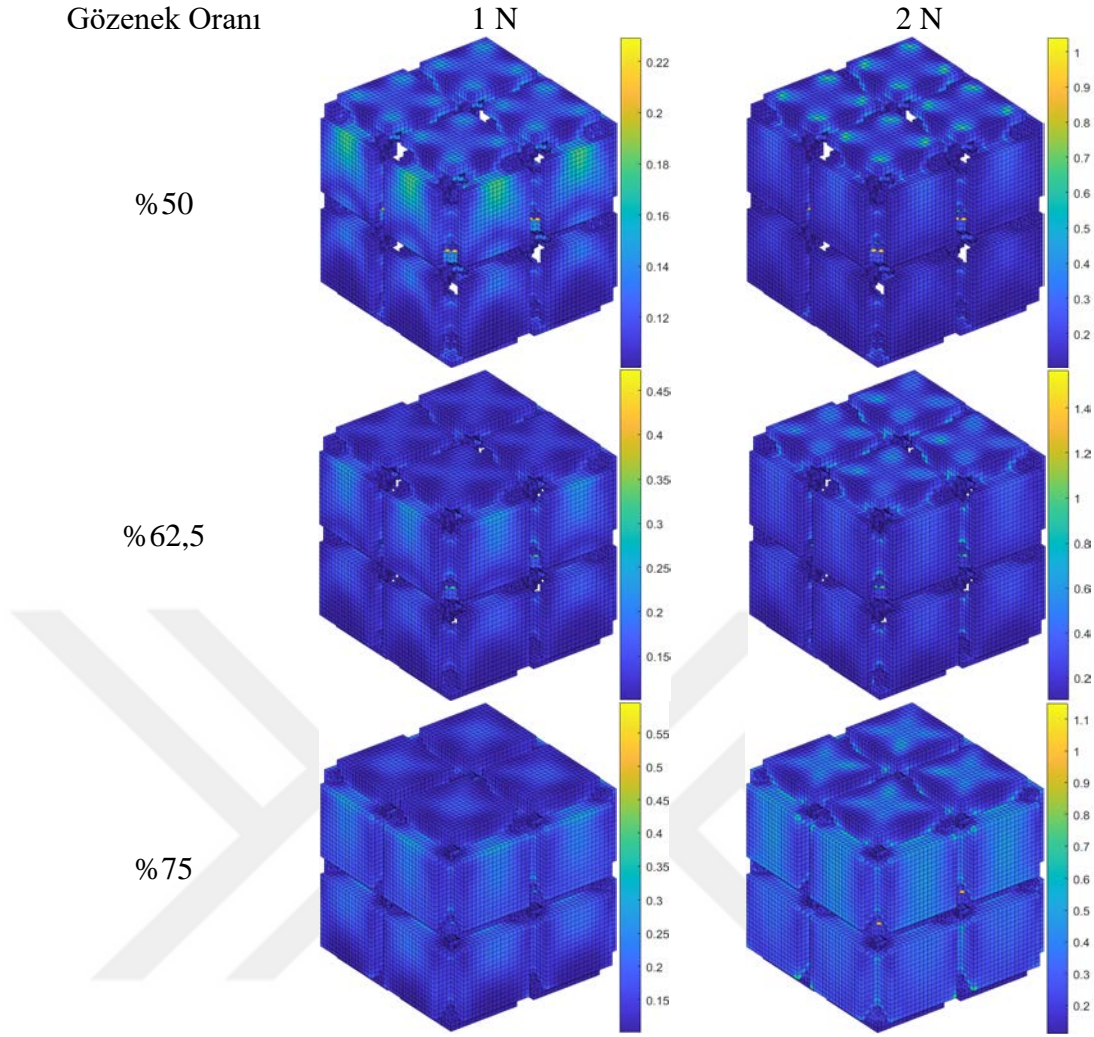
BC periyodik doku iskelesindeki kemik yoğunlukları artan yük ve gözeneklilik oranıyla birlikte artmıştır. En yüksek kemik yoğunluğu değeri olan $0,7 \text{ g/cm}^3$ BC75 doku iskelesinde 2 N’luk mekanik yük altında gözlenmiştir.



Şekil 3.29: In silico modelden elde edilen BCS doku iskeleleri üzerindeki kemik yoğunluk dağılımları.

Benzer şekilde BCS periyodik doku iskelesinde de kemik yoğunlukları artan yük ve gözeneklilik oranıyla birlikte artmıştır. En yüksek kemik yoğunluğu değeri olan $1,74 \text{ g/cm}^3$ BCS75 doku iskelesinde 2 N'luk mekanik yük altında gözlenmiştir. Bu değer sert kemiğin ulaşabileceği maksimum kemik yoğunluğu değeridir.

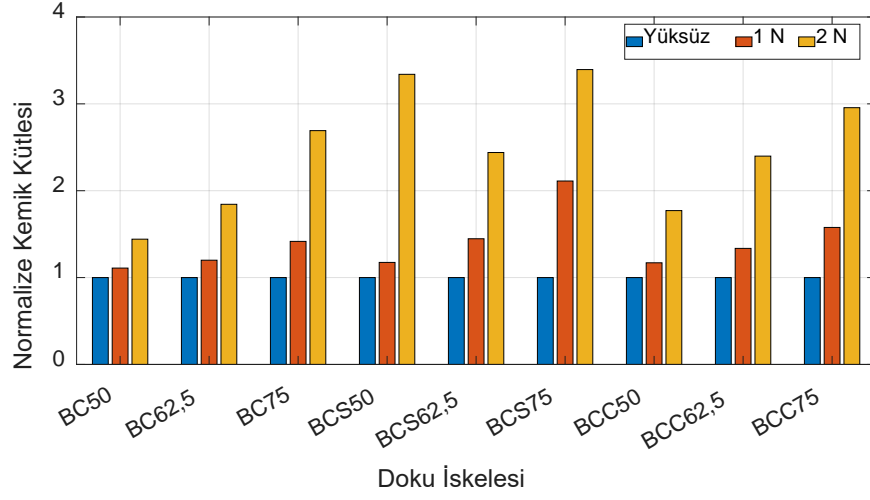
BCC doku iskelelerinde de artan yük ve gözenek oranıyla kemik yoğunluk değerlerinde artış gözlemlenmiştir. Eleman bazında en yüksek kemik yoğunluğu değeri 2 N mekanik yük etkisi altında BCC62,5 doku iskelesinde gözlemlenmesine rağmen 2 N mekanik yük etkisi altında BCC75 doku iskelesinde daha homojen kemik yoğunluğu dağılımı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.30: In silico modelden elde edilen BCC doku iskeleleri üzerindeki kemik yoğunluk dağılımları.

Şekil 3.31’de 21 günlük kemik yeniden yapılanma analizi sonucunda kemikleşme oranı değerleri verilmiştir. Kemikleşme oranı in silico analiz sonucundaki kemik kütlesinin başlangıçtaki kemik kütlesine oranlanmasıyla elde edilmiştir. In silico analizlerde başlangıçtaki kemik kütlesi in vitro deneylerdeki mekanik yük uygulanmayan kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Çünkü kullanılan kemik yapılanma modelinde mekanik yük olmadığı zaman herhangi bir kemik yapımı veya yıkımı olmayacaktır.

Şekil 3.31’de verilen in silico model sonuçları incelendiğinde tüm periyodik doku iskeleleri için artan mekanik yüklerle birlikte oluşan kemik kütlesinin de arttığı görülmektedir. En yüksek kemikleşme oranları %75 gözenek oranına sahip doku iskelelerinde olduğu görülmektedir.



Şekil 3.31: In silico modelden elde edilen normalize edilmiş kemik kütlesi sonuçları.

4. TARTIŞMA

4.1 Periyodik Doku İskelelerinin Mekanik Karakterizasyonu

Farklı tasarım parametreleri kullanılarak tasarlanan periyodik doku iskelelerinin tasarımları gerçekleştirildikten sonra mekanik karakterizasyonları hem deneysel olarak hem de sonlu elemanlar analiziyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te basma testinden elde edilen kuvvet-yer değiştirme ve enerji-yer değiştirme grafikleri verilmiştir. Şekil 3.3'teki grafik incelendiği zaman periyodik doku iskelelerinde 3 farklı bölge gözlemlenmiştir. Bunlar lineer, plato ve güçlenme bölgeleridir [86]. Periyodik doku iskelelerinin gözeneklilik oranı artıkça kuvvet değerleri buna bağlı olarak absorbe ettikleri şekil değiştirme enerjisi değerleri azalmaktadır. Lineer ve plato bölgesinde BCS geometrili doku iskelelerinde daha düşük kuvvet değeri gözlemlenmesine rağmen 2,5 mm yer değiştirme değerine geldiği zaman BCS geometrili doku iskelelerinin kuvvet değeri daha yüksektir. Bunun sebebi BCS doku iskelelerinin güçlenme bölgesine daha erken girmesidir.

Periyodik doku iskelelerinin rijitlik değerleri yük-yer değiştirme grafiğinin lineer bölgesinden hesaplanmıştır. Bu değerler sonlu elemanlar analizinden elde edilen rijitlik değerleriyle Şekil 3.7'de kıyaslanmıştır. BC ve BCC geometrili doku iskelelerinin sonuçları her üç gözeneklilik oranı içinde birbiriyle uyumlu çıkmasına rağmen BCS geometrili doku iskelelerinin sonlu elemanlar analizi sonuçları deneysel sonuçlardan daha yüksek çıkmıştır. Bunun sebebi 3 boyutlu yazıcıda BCS geometrili doku iskelelerinin üretimi esnasında meydana gelen üretim kusurlarıdır. Çünkü BCS doku iskeleleri sadece açılı çapraz çubuklardan oluşmaktadır ve bundan dolayı çubukların birleşim noktalarında meydana gelen yığılma mekanik özellikleri önemli derecede etkilemektedir. Ayrıca, bu tarz geometrilerin 3 boyutlu yazıcıda üretiminde katmanların birbirine iyi yapışmaması gibi üretim hatalarının da oluşma ihtimali fazladır. Şekil 3.2'de üretimi gerçekleştirilen periyodik doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri verilmiştir. BCS doku iskelesi için bahsedilen üretim problemleri taramalı elektron mikroskobu görüntülerinde de görülmektedir. BC doku

iskeleleri sadece yatay ve dikey çubuklardan oluşmaktadır. BCC doku iskeleleri ise yatay ve dikey çubukların yanı sıra açılı çapraz çubuklardan da oluşmaktadır. Bundan dolayı bu geometrilerin 3 boyutlu yazıcıda üretimi esnasında açılı çubuklarda üretim kusuru meydana gelse dahi yatay ve dikey çubuklarda üretim kusuru ihtimali daha düşük olduğu için sonuçlar birbirleriyle uyumlu çıkmıştır.

Periyodik doku iskelelerinin Von Mises gerilme ve eş değer birim şekil değiştirme dağılımları 1 N, 2 N ve 4 N yük değerleri altında incelenmiş olup Şekil E.1 ve Şekil E.2’de verilmiştir. Bu yük değerleri biyobozunma deneylerinde ve in vitro analizlerde kullanılan mekanik yük değerleridir. En yüksek Von Mises gerilme değeri BCS75 doku iskelesinde 4 N yük altındayken 4,5 MPa olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca en yüksek eş değer birim şekil değiştirme değeri de BCS75 doku iskelesinde 4 N yük altında $4500 \mu\epsilon$ olarak gözlemlenmiştir. Bu da hasara uğramaya en yakın doku iskelesinin BCS75 olduğunu göstermektedir. Özellikle Şekil 3.25’teki mikro-BT tarama görüntüleri incelendiğinde 1 N ve 2 N mekanik yük altında BCS75 doku iskelesinin hasara uğradığı gözlemlenmiştir.

Periyodik doku iskelelerinin gözeneklilik oranı arttıkça yüzey alanı ve hacim değerleri Çizelge 2.2’de de görüldüğü üzere azalmasına rağmen spesifik yüzey alanı artmaktadır. Doku iskelelerinin yüzey alanının yüksek olması doku mühendisliği uygulamalarında arzu edilen bir özelliktir. Çünkü yüksek yüzey alanına daha fazla hücre tutunabilmektedir [86]. Bu da doku iskelesinin uygulamada başarısını arttıracak bir tasarım parametresidir. Ayrıca kemik yapılanması mekanobiyolojik bir olgu olduğu için doku iskelelerinin spesifik enerji emilimi değerleri de önemli bir parametredir. Doku iskelelerinin spesifik enerji değerleri birim şekil değiştirme enerjisinin kütleye oranından hesaplanmıştır.

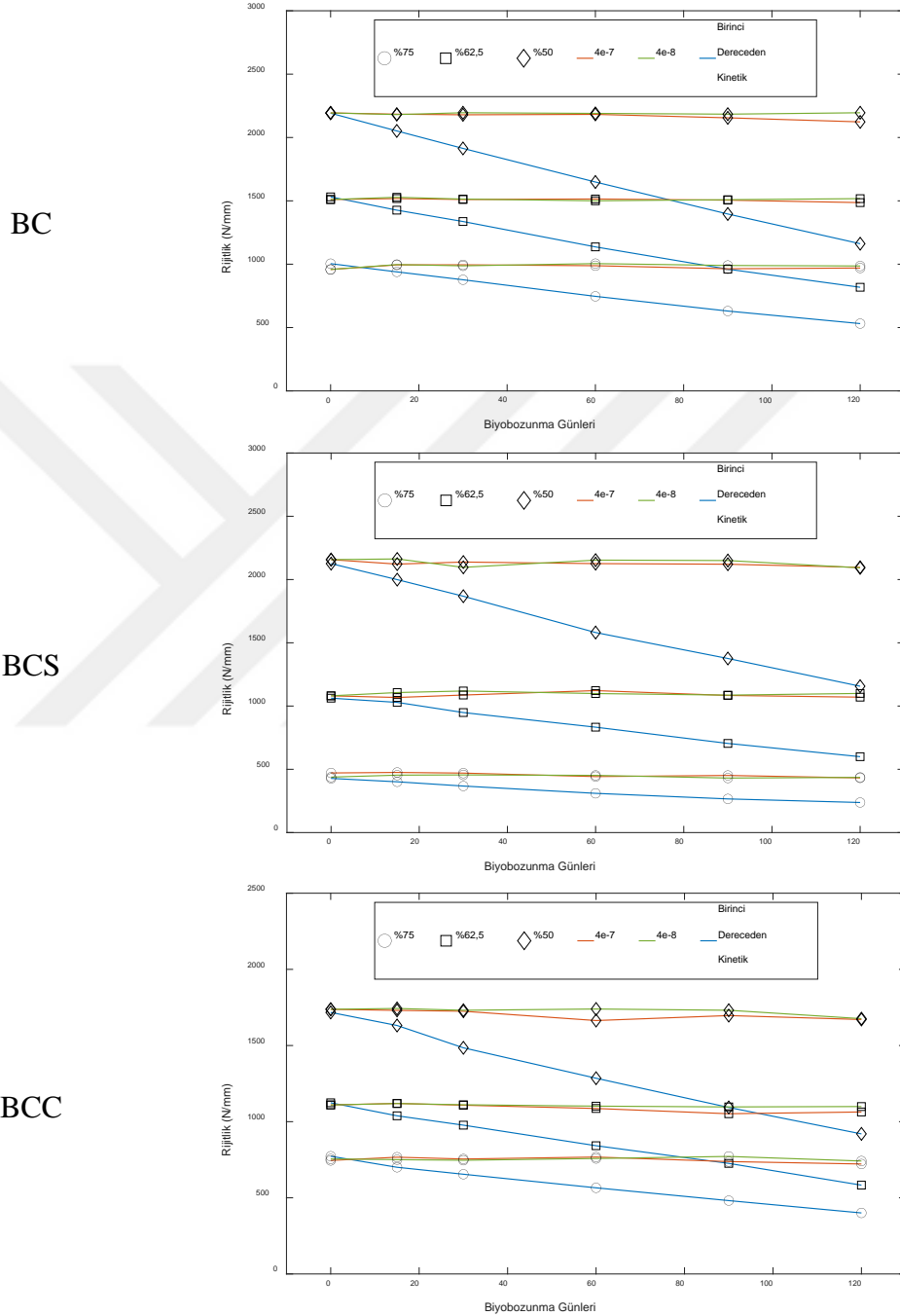
Şekil 3.5’te periyodik doku iskelelerinin spesifik enerji emilimi-spesifik yüzey alanı grafiği verilmiştir. Buradaki spesifik enerji emilimi değerleri basma testinden 4 N yük değeri için hesaplanmıştır. Bu grafik incelendiğinde en yüksek spesifik enerji emilimi değerine BCS75 doku iskelesi sahiptir. Bundan dolayı in vitro analizlerde en yüksek performansı BCS75 doku iskelesinin vermesi beklenmektedir. Mikro-BT taramalarından elde edilen normalize mineral sonuçlarına bakıldığında en yüksek mineral değeri 2 N yük altındaki BCS75 doku iskelesinde gözlemlenmiştir. Fakat Şekil 3.25’teki mikro-BT tarama görüntüleri incelendiğinde 2 N yük altında BCS75 doku iskelesinin hasara uğradığı görülmektedir. Bu da BCS75 doku iskelesinin kullanımını

kısıtlamaktadır. Ayrıca spesifik yüzey alanı da doku iskelesinin performansında etkili bir parametredir ve en yüksek spesifik yüzey alanına BCC75 doku iskelesi sahiptir. Aynı zamanda bu doku iskelesi ikinci en yüksek spesifik enerji emilimi değerine sahiptir. Şekil 3.27'deki mikro-BT taramasından elde edilen normalize sonuçlara göre 2 N yük altında ikinci en yüksek mineral değerine sahip doku iskelesi BCC75 doku iskelesidir. Şekil 3.26'daki BCC doku iskelelerinin mikro-BT görüntüleri incelendiğinde uygulanan yükün doku iskelesi üzerinde hasara sebep olmadığı görülmektedir.

4.2 Periyodik Doku İskelelerinin Biyobozunma Karakterizasyonu

Farklı tasarım parametrelerine (gözenek geometrisi ve oranı) sahip periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışı nümerik ve deneysel olarak analiz edilmiştir. Nümerik olarak ise 2 farklı yaklaşım kullanılmıştır. Bunlardan ilki birinci dereceden kinetik modeldir. Bu biyobozunma modelinde tüm doku iskelesi elemanlarının moleküler ağırlığının belli bir biyobozunma katsayısıyla azaldığı kabul edilmektedir. Ayrıca bu modelde uygulanan mekanik yükün de biyobozunmaya etkisi hesaplamalara dahil edilebilmektedir. Bundan dolayı da birinci dereceden kinetik biyobozunma modeli sonlu elemanlar kodlarıyla birlikte çalışacak şekilde Şekil 2.10'da verildiği gibi bir algoritma tasarımı yapılmıştır. İkinci nümerik biyobozunma modeli ise difüzyon esaslı bir modeldir. Bu modelde su doku iskelesi elemanlarının içerisine difüze olmaktadır ve buradaki su konsantrasyonuna göre moleküler ağırlık değişimi hesaplanmaktadır. Doku iskelesi elemanlarındaki su konsantrasyonu değerleri ise Denklem 2.6'da verilen difüzyon denklemleriyle hesaplanmıştır. Bu denklemlerde ise 4×10^{-7} mm²/gün ve 4×10^{-8} mm²/gün olmak üzere iki farklı difüzyon katsayısı seçilmiştir. Bu katsayılar biyobozunma deneylerinden elde edilen sonuçlara göre seçilmiştir. Nümerik modellerde biyobozunma periyodik doku iskelelerinin rijitlik değerlerinin değişimi üzerinden karakterize edilmiştir. Bunun için de sonlu elemanlar kodunda biyobozunma modellerinden elde edilen elastisite modülleri kullanılarak doku iskelelerinin farklı biyobozunma günleri için rijitlik değerleri nümerik olarak elde edilmiştir. Periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışı deneysel olarak da incelenmiştir. Biyobozunma deneyleri 4 N'luk mekanik yük altında gerçekleştirilmiş olup mekanik yükün biyobozunma üzerine etkisini de irdeleyebilmek için kontrol grubu olarak yüksüz durumda da biyobozunma deneyleri yürütülmüştür.

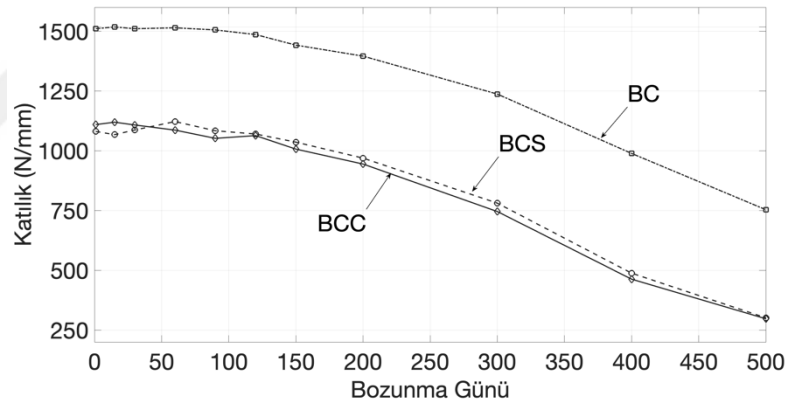
Deneysel olarak periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışını karakterize etmek için su emilimi, ağırlık kaybı ve rijitlik değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca biyobozunma deneylerinden elde edilen rijitlik değerleriyle nümerik analizlerden elde edilen rijitlik değerleri kıyaslanmıştır.



Şekil 4.1: Periyodik doku iskelelerinin nümerik biyobozunma modellerinden elde edilen rijitlik sonuçları.

Şekil 4.1’de periyodik doku iskeleleri için her iki nümerik biyobozunma yaklaşımından da elde edilen rijitlik değerlerinin kıyaslanması verilmiştir.

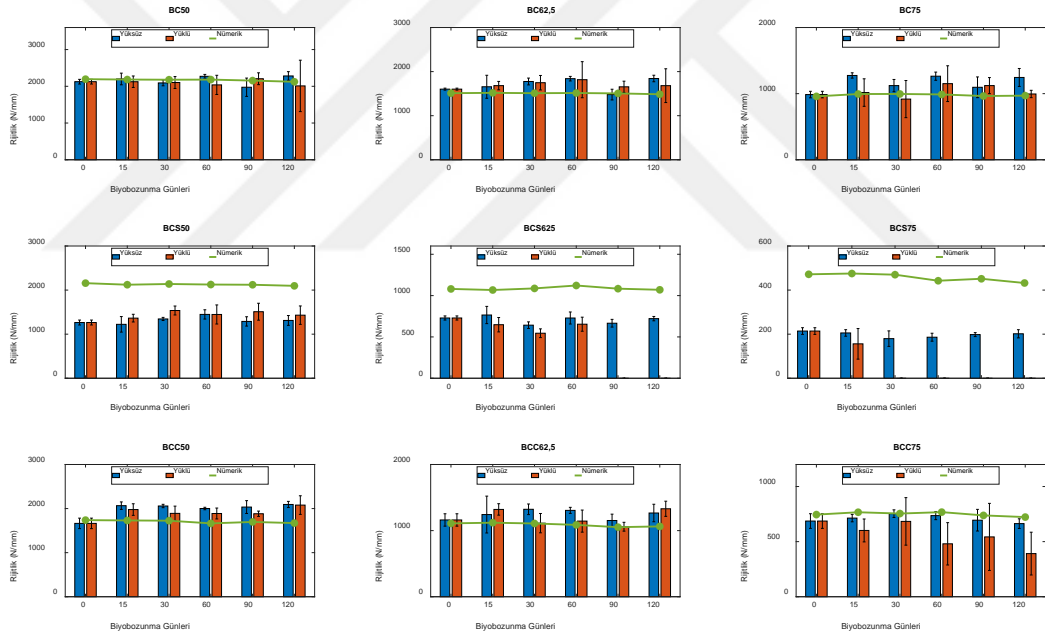
Şekil 4.1’de verilen sonuçlara bakıldığı zaman iki farklı nümerik biyobozunma modelinden elde edilen rijitlik değerlerinin değişimi birbirinden farklıdır. Bu farklılığın temel sebebi birinci dereceden kinetik model tüm doku iskelesi elemanlarının sabit bir katsayı ile biyobozunmaya uğradığını kabul etmesidir ve 120. güne gelindiğinde periyodik doku iskelelerinin rijitlik değerlerinin yaklaşık olarak %38 düştüğü görülmektedir. Oysa difüzyon esaslı model ise suyun konsantrasyonuna göre doku iskelesinin biyobozunma özelliklerini hesaplamaktadır ve deneysel sonuçlarla uyumlu çıkması için difüzyon katsayıları oldukça düşük seçilmiştir. Bundan dolayı 120. günün sonuna gelindiğinde doku iskelelerinin rijitlik değerleri hemen hemen başlangıç değerleriyle aynı kalmış hatta bazı günlerde az da olsa artış gözlemlenmiştir. Bunun nedeni Şekil 2.11’de de gösterildiği gibi sonlu elemanlar analizinde basma simülasyonlarının sıvıyla birlikte yapılmasıdır. Biyobozunma deneylerinde de basma testleri ıslak durumda yapılmış olduğu için bu şekilde simülasyonla deney arasında benzer şartlar oluşturulmuştur.



Şekil 4.2: %62,5 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin 500 günlük difüzyon esaslı biyobozunma analizi sonuçları.

Şekil 4.2’de %62,5 gözenek oranına sahip periyodik doku iskelelerinin 500 gün boyunca yapılan difüzyon esaslı biyobozunma analizi sonuçları verilmiştir. Bu analizlerde difüzyon katsayısı olarak $4e-7 \text{ mm}^2/\text{gün}$ kullanılmıştır. 500 günlük difüzyon esaslı biyobozunma analizi sonuçlarına bakıldığında ilk 120 günde değişim gözlemlenmezken 150 günden sonra düşüşler başlamıştır. 500. güne geldiği zaman BCS doku iskelesindeki düşüş %73, BCC doku iskelesindeki düşüş %72 ve BC doku iskelesindeki düşüş ise %50 civarındadır. Bu sonuçlar birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinden oldukça farklıdır. Wu ve Ding (2005) yapmış oldukları çalışmada doku iskelelerinin 3 aşamalı biyobozunma davranışı gösterdiğini

açıklamışlardır [89]. İlk aşama neredeyse stabil aşama olarak tanımlanmıştır. Bu aşamada doku iskelelerinin mekanik özellikleri, ağırlık ve boyutsal değişimleri değişmemektedir. Aşama I difüzyon esaslı biyobozunma yaklaşımıyla simüle edilebilmiştir. Difüzyon esaslı biyobozunma simülasyonlarındaki 120 günlük süre biyobozunma olgusunun ilk aşaması olarak kabul edilebilir. İkinci aşamada ise doku iskelelerinin mekanik özellikleri hızlıca düşmeye başlamaktadır. Fakat ağırlık ve boyutsal değişimler bu aşamada da nispeten sabit kalmaktadır. 500 günlük difüzyon esaslı biyobozunma analizi sonuçlarına bakıldığı zaman 150 günden sonrası biyobozunma olgusunun ikinci aşaması olarak düşünülebilir. Ayrıca birinciden kinetik biyobozunma yaklaşımının da doğrudan ikinci aşamayı modellediği kabul edilebilir. Üçüncü aşamaya gelindiğinde ise doku iskeleleri ağırlık kaybı ve çökme göstermektedir. Bu aşamaya geçildiği zaman doku doku iskelesi yapısal bütünlüğünü kaybetmektedir.



Şekil 4.3: Periyodik doku iskeleleri için difüzyon esaslı biyobozunma simülasyonu sonuçlarıyla deneysel sonuçların kıyaslanması.

Şekil 4.3'te periyodik doku iskelelerinin $4e-7 \text{ mm}^2/\text{gün}$ difüzyon katsayısı kullanılarak gerçekleştirilen difüzyon esaslı biyobozunma simülasyonlarından elde edilen rijitlik değerlerinin biyobozunma deneylerinden elde edilen rijitlik değerleriyle kıyaslanması verilmiştir. Sonuçlar incelendiği zaman BCS doku iskeleleri hariç sonuçların birbiriyle oldukça uyumlu olduğu görülmektedir. BCS doku iskelelerinde simülasyon sonuçlarının deneysel sonuçlardan yüksek çıkmasının sebebi üretim

kusurları içermesinden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak difüzyon esaslı biyobozunma yaklaşımının biyobozunma deneylerinden elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir. Birinci dereceden kinetik biyobozunma yaklaşımı ise biyobozunmanın ikinci aşamasını simüle etmek için kullanılabilir.

Periyodik doku iskelelerinin biyobozunma deneylerinden rijitlik değerlerinin yanında su emilimi ve ağırlık kaybı değerleri de elde edilmiştir. Su emilimi, doku iskelelerinde vücut sıvısının emilimini, besin taşınmasını ve biyolojik biyobozunma davranışını etkileyebilir ve kemik doku iskeleleri için araştırılması önemlidir [90,91]. Yüklü ve yüksüz koşullar altında tüm geometriler ve gözeneklilik oranları için su emilimi genel eğilim açısından incelendiğinde, su emiliminin hem yüklü hem de yüksüz numuneler için 60 gün boyunca maksimum değere ulaştığı görülmektedir. Su emilimi daha sonra azalma eğilimine girmiştir. Su emme davranışındaki değişiklikler, değişen geometrik özelliklerden kaynaklanmaktadır. Bu sonuç literatürde incelenen diğer çalışmalarla uyumludur. Geometrik özellikler değiştirilerek doku iskelelerin yüzey alanı/hacim oranı, boyutu ve yapısı değiştirilebilir ve buna bağlı olarak su emme kinetiği de değiştirilebilir [92,93]. Suyun daha yüksek yüzey alanına sahip doku iskeleleri tarafından daha hızlı emilmesi ve doku iskelesinin hacmi arttıkça doku iskelelerin su emme miktarının da artması beklenmektedir [94]. Biyobozunma deneyleri gerçekleştirilen periyodik doku iskeleleri için, yüksüz koşullar altında 60 gün boyunca en yüksek su emilimi %25 civarında %62,5 gözenekliliğe sahip BCC geometrisi için gerçekleşmiştir. En az emilim %5 civarında BC geometrisi için %50 gözeneklilik ve 120 gün yüksüz koşullarda gerçekleşmektedir. Genel olarak, su emilimi $BCC > BCS > BC$ şeklindedir. BC ve BCS geometrileri için gözeneklilik oranı azaldıkça su emilimi azalırken, BCC geometrisi için tam tersi geçerlidir. Bu fark, doku iskelelerinin yüzey alanları göz önünde bulundurularak açıklanabilir. BCC doku iskelesinin yüzey alanı gözeneklilikteki değişimler nedeniyle önemli değişikliklere uğrarken, BC ve BCS doku iskelelerinin gözeneklilik değişimleri ile yüzey alanında nispeten daha küçük değişiklikler göstermektedir. Yüzey alanı arttıkça, doku iskelelerinin su molekülü ile etkileşimleri hızlanmakta ve biyobozunma ortamına daha fazla yüzey alanıyla maruz kaldığı için su emilim değerleri artmaktadır [95].

Mekanik yükün su emilimi üzerindeki etkisi incelendiğinde, BC doku iskelelerinde yük etkisi altında daha fazla su emilimi gerçekleştiği, BCC doku iskelelerinde ise 90 güne kadar daha az su emilimi gerçekleştiği görülmüştür. Sonrasında ise BCC doku

iskelelerinde farklı gözenek oranlarında birbirleri arasında karışık davranış sergilemiştir. Bu farklılık, BC'de daha yüksek rijitliğin daha az deformasyona yol açtığı ve suyun mikro gözeneklerden hala yayılabildiği, BCC için ise daha az rijitliğin daha yüksek deformasyonlara yol açtığı ve mikro gözeneklerin kapanabildiği ve suyun yayılamadığı rijitlik farkından kaynaklanabilir. Yang ve diğ. (2008) dinamik koşullar altında döngüsel yüklemenin PBS çözeltisinin kuvvetli bir şekilde akmasına neden olabileceğini belirtmiştir [96]. Bu nedenle, biyobozunmanın doku iskelelerinin hem yüzeyinde hem de içinde meydana geldiğini ve daha hidrofilik biyobozunma ürünlerinin birikebileceğini bildirmişlerdir.

Neredeyse tüm periyodik doku iskeleleri için ilk 120 gün boyunca çoğunlukla ağırlık artışı vardır ve ağırlık artışı su emilimine kıyasla her zaman daha küçüktür, bu da 48 saatlik kurutma işlemine rağmen suyun bir kısmının doku iskelesinin içinde hapsoldüğünü gösterir. Bu durum büyük olasılıkla ilk aşamadaki rijitliğin devam etmesinin ana nedeni olabilir. Literatürde farklı çalışmalarda benzer sonuçlarla karşılaşıldığı görülmüştür [97-99]. Bejanaro ve diğ. (2020), hapsolmuş suyun belirtilen kurutma süreleri içinde çıkmasının zor olabileceği yorumunu yapmış ve ek bir kurutma işlemi uygulamıştır [97]. Bununla birlikte, çalışmalarında hapsolmuş suyun çıkarılmasında önemli bir fark gözlemlenmiştir. Biyobozunma deneylerinde, su emilimi ve ağırlık kayıpları göz önünde bulundurulduğunda, suyun doku iskeleleri içinde hapsoldüğü fikri, biyobozunmanın ilk aşaması için baskın mekanizmadır. İlginç bir şekilde, rijitlik önemli ölçüde değişmese de mekanik yük ilk aşamayı etkilemektedir.

Son olarak biyobozunma deneylerinden elde edilen rijitlik değerleri incelendiğinde periyodik doku iskelelerinin rijitlik değerleri 120 günlük biyobozunma deneyi süresince ciddi oranda değişmemiştir. Bu durumun, daha önce ağırlık kayıplarında tartışılan hapsolmuş bozunma ortamından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Çünkü sıkışan biyobozunma ortamı (PBS sıvısı) sıkıştırılmaz özellik göstermiş ve basınçlı yüklemeye karşı doku iskelelerinin rijitlik değerlerini artırmış olabilir. Literatürdeki farklı çalışmalarda mekanik özelliklerin belirli bir biyobozunma süresine kadar korunduğu ya da arttığı gözlemlenmiştir. McKenna ve diğ. (2019) yaptıkları çalışmada elastik modül değerlerinin belirli bir süre arttığını ancak bu süreden sonra modül değerlerinin bozunma öncesi (0. gün) değerlere göre daha da azaldığını

gözlemlenmişlerdir [100]. Ayrıca Wu ve Ding (2005) çalışmalarında ilk aşamada doku iskelelerinin sabit kaldığını belirtmiştir.

Periyodik doku iskelelerinin biyobozunma deneylerinden elde edilen sonuçlara göre ilk 120 günde biyobozunma olgusunun birinci aşamasında olduğu görülmüştür.

4.3 Periyodik Doku İskelelerinin In Vitro Karakterizasyonu

Mekanik uyarı etkisi altında farklı tasarım parametrelerine (farklı gözenek geometrisi ve oranı) sahip periyodik doku iskelelerinin in vitro ortamda karakterizasyonunu gerçekleştirmek için canlılık analizi, ALP enzim aktivitesi, mineralizasyon analizi ve mikro-BT analizleri gerçekleştirilmiştir. Canlılık analizinde ve ALP enzim aktivitesinin ölçümünde mekanik uyarı olarak sadece 2 N yük günde 30 dakika olarak uygulanmış olup kontrol grubu olarak yüksüz durum seçilmiştir. %50 gözenek oranına sahip BC, BCS ve BCC doku iskelelerinin canlılık analizi sonuçları Şekil 3.18'de verilmiştir. BCC50 doku iskelesinde 2 N'luk mekanik yük etkisi altında canlılıkta 18 katlık bir artış gözlemlenirken, BCS50 doku iskelesinde ise canlılıkta 5 katlık bir artış gözlemlenmiştir. BC50 doku iskelesinde ise mekanik yükün canlılık üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür. Aynı koşullar altında %75 gözenek oranına sahip doku iskelelerinin canlılık analizi sonuçları Şekil 3.19'da verilmiştir. Bu durumda ise 2 N mekanik yük etkisi altında BCS75 doku iskelesinde yaklaşık 6 kat hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir. BC75 ve BCC75 doku iskelelerinde ise canlılık oranı yüksüz durumla hemen hemen aynı kalmıştır.

hFOB 1.19 hücreleri ekilmiş doku iskelelerine osteojenik farklılaşma mediumuna alındıktan sonra 7 gün boyunca günde 30 dakika olmak üzere 2 N'luk mekanik yük uygulanmış ve 7 günün sonunda ALP enzim aktivitesi ölçülmüş olup sonuçları Şekil 3.21 ve Şekil 3.22'de verilmiştir. Tüm doku iskeleleri için mekanik uyarının ALP enzim aktivitesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Mekanik yükün kemik dokusu üzerine etkisini daha iyi anlayabilmek için mineralizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Periyodik doku iskelelerinin mineralizasyon analizlerini gerçekleştirmek için BCS ve BCC doku iskeleleri üzerine mekanik yük osteojenik farklılaşma mediumuna alındıktan sonra 21 gün boyunca günde 30 dakika uygulanmıştır. Mekanik yük olarak 1 N ve 2 N'luk yükler kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak yüksüz durumdaki hFOB 1.19 hücreleri ekilmiş

periyodik doku iskeleleri kullanılmıştır. 21 günün sonunda Alizarin Kırmızısı S boyasıyla doku iskeleleri boyandıktan sonra inverted mikroskop ile görüntüleri kaydedilmiştir. Kaydedilen bu görüntüler Şekil 3.23'te verilmiştir. Eğer mineral varsa doku iskelesi üzerinde kırmızı bir renk oluşmaktadır. Hücresiz olan doku iskelelerinde herhangi bir kırmızı renk oluşumu gözlemlenmemiştir. Mekanik yük etkisi altındaki doku iskelelerinde daha fazla kırmızılık gözlemlenmiştir. Ayrıca periyodik doku iskeleleri üzerindeki mineralleri kantitatif olarak analiz etmek için periyodik doku iskelelerinde bulunan kalsiyum depozitleri ekstraksiyon yöntemiyle çıkarılmıştır. Daha sonra elde edilen süpernatantların absorpsiyonları 570 nm'de mikropilokrom okuyucu'da okunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.4'te verilmiştir. Mineralizasyon analizlerinde de kontrol grubu olarak mekanik yükün uygulanmadığı periyodik doku iskeleleri seçilmiştir. Mekanik yükün uygulandığı değerler kontrol grubunun değerlerine göre normalize edilmiştir. Normalize edilen sonuçlar Şekil 3.24'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre mekanik yükün kemik oluşumunda etkin bir rolü olan mineral depozitlerinin oluşumu üzerinde olumlu etkisinin olduğu açıkça görülmektedir. Mineralizasyon sonuçlarına göre en yüksek değer 2 N yük altında BCC75 doku iskelesinde gözlemlenmiştir. Aynı zamanda BCC75 doku iskelesi en yüksek spesifik yüzey alanı değerine sahip doku iskelesidir.

Mikro-BT analizleri için mineralizasyon analizinde izlenen yolun aynısı izlenilmiştir. Mekanik yük olarak 1 N ve 2 N'lük yükler kullanılmış olup kontrol grubu olarak mekanik yük uygulanmamış doku iskeleleri kullanılmıştır. 21 günün sonunda doku iskeleleri 1x PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra %10 formalin ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilerek Mikro-BT taramaları için hazır hale getirilmiştir. Mikro-BT analizindeki parametreler Çizelge 3.5'te verilmiştir. BCS ve BCC periyodik doku iskelelerinin mikro-BT görüntüleri ise Şekil 3.25 ve Şekil 3.26'da verilmiştir. Her bir doku iskelesi için iki farklı görüntü alınmıştır. Bunlardan ilki herhangi bir filtreleme işlemi yapmadan periyodik doku iskelelerini gösteren görüntüdür. Diğerisi ise periyodik doku iskelelerini filtreleyerek sadece hFOB 1.19 hücrelerinin ürettiği mineralleri gösteren görüntüdür. Şekil 3.25'teki BCS doku iskelelerinin mikro-BT görüntüleri incelendiğinde mekanik yükün BCS75 doku iskelesine hasar verdiği görülmüştür. BCC doku iskelelerinde ise hasar gözlemlenmemiştir.

Periyodik doku iskeleleri üzerinde mekanik yükün etkisini mikro-BT analiziyle karakterize edebilmek için sadece mineralleri gösteren görüntüler kullanılmıştır.

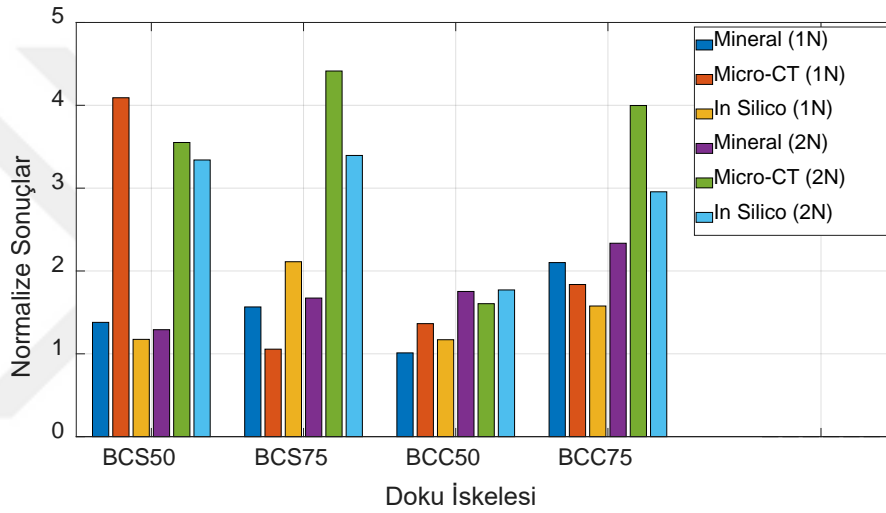
Mineral görüntülerindeki beyaz pikseller mineralleri temsil ettiği için görüntü işleme yöntemiyle her bir görüntüdeki beyaz piksellerin sayısı belirlenmiş olup sonuçları Çizelge 3.5'te verilmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen yüksüz durumdaki doku iskelelerinin piksel sayısına göre mekanik yüklü durumdaki doku iskelelerinin piksel sayısı normalize edilmiştir. Normalize edilmiş mikro-BT analiz sonuçları Şekil 3.27'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre mekanik yükün mineral oluşumu üzerine belirgin bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. En yüksek sonuç 2 N yük altında BCS75 doku iskelesinde gözlemlenmiştir. BCS75 doku iskelesi aynı zamanda en yüksek spesifik enerji emilimi değerine sahip doku iskelesidir. Bu da mekanik testlerden elde edilen sonuçla uyumlu olduğunu göstermektedir. Fakat BCS75 doku iskelesinin uygulanan mekanik yükler sonucunda hasara uğradığı göz ardı edilmemelidir. Normalize edilmiş mikro-BT sonuçları incelendiği zaman BCS50 doku iskelesi hariç artan mekanik yüklerle birlikte mineral oluşumunun da arttığı bir eğilim vardır.

4.4 Periyodik Doku İskelelerinin In Silico Model ile Karakterizasyonu

In silico model sayesinde doku iskelesi malzemesi biyobozunmaya uğrarken eş zamanlı olarak kemik dokusundaki değişimler gözlemlenebilmektedir. Fakat periyodik doku iskelelerinin biyobozunma deneyi sonuçlarına göre 120. güne geldiğinde dahi mekanik özelliklerde pek değişim gözlemlenmemiştir. Bundan dolayı da in silico modele doku iskelelerinin biyobozunma davranışı dahil edilmemiştir. Periyodik doku iskelesi üzerindeki kemik dokusunun yoğunluk değişimi ise Denklem 2.16'da verilen kemik yapılanma modeli kullanılarak hesaplanmaktadır. Fakat kullanılan kemik yapılanma modeli bazı katsayılar içermektedir. Bu katsayılar da sonucu doğrudan etkilemektedir. In vitro analizler sayesinde (Mineralizasyon ve Mikro-BT) bu katsayılar tespit edilmiştir. In silico modelde kullanılan katsayıların belirlenmiş olması doku iskelesi tasarımı yapmak için önemli bir çıktıdır.

In silico modelde kullanılan kemik yapılanma modelindeki katsayılar belirlendikten sonra simülasyonlar 21 güne karşılık gelecek şekilde 21 çevrim çalıştırılmıştır. In silico modelde her bir çevrim bir güne karşılık gelmektedir. In silico modelden BC, BCS ve BCC doku iskeleleri için kemik yoğunluk dağılımları elde edilmiş ve sonuçları Şekil 3.28-30'da verilmiştir. Ayrıca mikro-BT ve mineralizasyon analizinden elde edilmiş normalize sonuçlarla in silico modelden elde edilmiş sonuçları kıyaslamak için simülasyon sonundaki kemik kütlesi başlangıç kemik kütlesine göre normalize

edilmiştir. In silico analiz sonuçlarını mineralizasyon ve mikro-BT analizi sonuçlarıyla kıyaslayabilmek için normalizasyon işlemi %50 ve %75 gözenek oranına sahip BCS ve BCC doku iskeleleri için gerçekleştirilmiştir. In vitro ve in silico analizlerden elde edilen tüm normalize edilmiş sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir. Şekil 4.4'teki normalize edilmiş sonuçlar incelendiğinde 1 N yük altında BCS50 doku iskelesinin mikro-BT analizinden elde edilen sonuç dışında diğer sonuçlar birbiriyle uyumlu çıkmıştır. Mikro-BT analizi sonuçları bakımından en yüksek sonuç 2 N'luk mekanik uyarı etkisi altında BCS75 doku iskelesinde gözlemlenmiştir. Mineralizasyon analizi sonuçları incelendiği zaman ise en yüksek sonuç 2N yük altında BCC75 doku iskelesinde gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4: Normalize edilmiş sonuçlar.

In silico analizden elde edilen sonuçlarda ise 2 N yük altında BCS75 doku iskelesi en yüksek değere sahiptir. Sonuç olarak BCS75 ve BCC75 doku iskelelerinin en iyi sonuçlara sahip olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemik doku iskeleleri kemik doku mühendisliği uygulamalarının önemli unsurlarından birisidir. Ayrıca sağlıklı bir şekilde kemik dokusunun kendisini yenileyebilmesi için kullanılan doku iskelelerinin de birçok özelliğe sahip olunması gereklidir. Bunlar hücrelerin tutunup büyüebilmesi için yeterince geniş yüzey alanı, besin ve oksijen difüzyonu için gözeneklilik, mekanik dayanım, biyouyumluluk ve biyobozunma gibi sıralanabilir. Kemik yenilenme süreci mekanobiyojik bir süreç olduğu için kemik doku mühendisliği uygulamasında kullanılacak doku iskelesindeki gerilme ve şekil değiştirme dağılımı doğrudan kemik yenilenme sürecini etkileyecektir. Gözenekli kemik doku iskelesi tasarımında farklı gözenek geometrileri veya gözenek oranı gibi farklı tasarım parametreleri kullanarak kemik yenilenme süreci de iyileştirilebilir. Çünkü gözenek geometrisi veya gözenek oranı değiştiği zaman doku iskelesi üzerindeki gerilme ve şekil değiştirme dağılımı tamamen değişecektir. Bu da doğrudan kemik yenilenme sürecini etkileyecektir. Ayrıca bu tasarım parametrelerinin değiştirilmesi de doku iskelelerinin mekanik dayanımını ve biyobozunma davranışını da etkileyecektir. İdeal bir doku iskelesi tasarımı yapmak için tüm bunların eş zamanlı olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Farklı tasarım parametrelerine sahip periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışı hem iki farklı nümerik yaklaşımla hem de mekanik yük etkisi altında deneysel olarak incelenmiştir. Doku iskelesi boyutları ve gözenek oranlarına (%50, %62,5 ve %75) göre belirlenmiş ve mekanik yük etkisi altında doku iskeleleri için kabul edilebilir bir gerilme değeri oluşturacak 4 N'luk mekanik yük biyobozunma süresi boyunca sürekli olarak uygulanmıştır. Biyobozunma deneyleri 120 gün boyunca gerçekleştirilmiş olup bu sürede kayda değer mekanik özellik ve ağırlık kaybı değişimi olmamıştır. Buradan da ilk 120 günde doku iskelelerinin biyobozunma olgusunun ilk aşamasında olduğu anlaşılmıştır. Doku iskeleleri için biyobozunma davranışını nümerik olarak karakterize etmek için kullanılan birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinde belirli bir katsayı ile tüm doku iskelesi elemanlarının moleküler ağırlığı azalmaktadır ve buna bağlı olarak da elastisite modülü değerleri

başlangıçtan itibaren sürekli olarak düşmektedir. Bu nümerik model biyobozunmanın bir sonraki aşamasını karakterize etmektedir. Difüzyon esaslı biyobozunma modeli ise doku iskelesi elemanlarının içerisindeki su konsantrasyonuna göre moleküler ağırlık değişimini dikkate almaktadır. Su ise doku iskelesi elemanlarının içerisine difüzyon yoluyla girmektedir ve bu değerler difüzyon denklemiyle hesaplanmıştır. Bu modelde $4e-7 \text{ mm}^2/\text{gün}$ ve $4e-8 \text{ mm}^2/\text{gün}$ olmak üzere iki farklı difüzyon katsayı kullanılmıştır. Kullanılan bu katsayılarla 120 günlük biyobozunma analizleri yapılmış ve deneysel sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca bu model 500 güne kadar %62,5 gözenek oranına sahip doku iskeleleri için çalıştırılmış olup 150. günden itibaren doku iskelelerinin rijitlik değerlerinin ciddi oranda düşmüştür. Bu da difüzyon esaslı biyobozunma modelinin hem birinci aşamayı hem de ikinci aşamayı kapsadığını göstermektedir. İdeal bir doku iskelesi tasarımı gerçekleştirmek için biyobozunma davranışının iyi bir şekilde analiz edilmesi gereklidir. Bu noktada tez çalışmasının biyobozunma karakterizasyonu kısmında elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir.

- Nümerik modellerden birinci dereceden kinetik biyobozunma modeli biyobozunma olgusunun ikinci aşamasını ele almaktadır.
- Difüzyon esaslı modelden elde edilen sonuçlar biyobozunma deneyleriyle uyumlu çıkmıştır. Bu model 500 güne kadar çalıştırılmış olup biyobozunma olgusunun hem birinci aşamasını hem de ikinci aşamasını kapsamaktadır. Difüzyon esaslı modele göre 150. günden sonra biyobozunmanın ikinci aşaması başlamaktadır.
- Su emilimi hücre büyümesi için önemlidir. Biyobozunma deneylerinde tüm periyodik doku iskeleleri 60. günde maksimum su emilimine ulaşmıştır. %62,5 gözenek oranına sahip BCC doku iskelesi en yüksek su emilim seviyesine sahiptir.
- Ağırlık artış oranına kıyasla daha fazla su emme oranı, içeride hapsolmuş su anlamına gelir ve Aşama I'deki artan rijitlik, sıkıştırılamaz sıvı birikimiyle ilişkili olabilir.
- Biyobozunma deneylerinden elde edilen sonuçlara göre doku iskelelerinin yüzey alanı ve başlangıç rijitliği, biyobozunma sırasında rijitlik değişimi için belirli bir eğilim yaratmamaktadır. Başka bir deyişle, yüzey alanını artırmanın veya azaltmanın daha iyi doku iskelesi tasarımı için belirli faydalar yaratabileceğini söylemek mümkün değildir. Bununla birlikte, %75'lik BC ve

%50'lik BCC, biyobozunma sırasında uzun süreli dayanıklılık için avantaj olabilecek bir rijitlik artışı sunmaktadır.

- %62,5 gözenek oranına sahip BCC su emilimi açısından en iyi çözümü sunarken, %75 gözenek oranına sahip BC ve %50 gözenek oranına sahip BCC Aşama I'de en yüksek rijitlik artışını sunmaktadır. 4 N'luk mekanik yük etkisi altında %75 gözenek oranına sahip BCS doku iskelesinde yaklaşık 4500 $\mu\epsilon$ 'lik maksimum eş değer birim şekil değiştirme değeri görülmektedir ve bu nedenle hasara uğradığı için 15. günden itibaren yüklü biyobozunma deneylerine devam edilmemiştir. Bu nedenle biyobozunma açısından, optimum doku iskele geometrisi %50-62 arasında gözenekliliğe sahip BCC olacaktır.

In vitro deneylerde farklı tasarım parametrelerine sahip periyodik doku iskeleleri üzerindeki kemik hücrelerinin mekanik yük etkisi altında nasıl davrandıklarını karakterize edebilmek için şu analizler gerçekleştirilmiştir.

- Mekanik yük etkisi altında canlılık analizi
- Mekanik yük etkisi altında ALP enzim aktivitelerinin ölçülmesi
- Mekanik yük etkisi altında mineralizasyon analizleri
- Mekanik yük etkisi altında mikro-BT analizleri

Canlılık ölçümleri %50 ve %75 gözenek oranına sahip BC, BCS ve BCC doku iskelelerinde 2 N'luk mekanik yükün günde 30 dakika uygulanarak 2 günün sonunda gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak ise yükün uygulanmadığı doku iskeleleri kullanılmıştır. %50 gözenek oranına sahip doku iskelelerinde BCC doku iskelesine uygulanan 2N'luk yükün yüksüz BCC doku iskelesine oranla canlılıkta yaklaşık olarak 18 katlık bir artış gözlemlenmiştir. Aynı koşullarda %75 gözenek oranında ise en etkili artış 2 N'luk yük etkisi altındaki BCS geometrisinde görülmüştür. Canlılık sonuçlarına göre in vitro koşullarda optimum geometrinin %50 porozitede BCC olduğu ölçülmüştür.

ALP enzim aktivitesi ölçümleri de canlılık analizlerinde kullanılan doku iskeleleriyle 2 N'luk yük ile gerçekleştirilmiştir. Alkalen fosfotaz bir erken osteoblast farklılaşma belirteçidir. Enzim aktivitesiyle birlikte osteoblast mineralleşme metabolizması aktive edilir. Osteoblast hücrelerinin mineral depozitleri oluşturması 21-28 gün arasında (geç farklılaşma belirteci) gerçekleşen bir süreçtir. Bu kısımda erken farklılaşma belirteci olan ALP enzim aktivitesi 7 gün sonunda değerlendirilmiştir. ALP enzim aktivitesi

farklı gözenek oranı ve geometrilerde kontrol gruplarıyla kıyaslandığında önemli bir değişiklik göstermemiştir. Ancak uygulanan yükün PLA doku iskeleleri üzerindeki kemik oluşumunu tetiklemesini gözlemleyebilmek için daha uzun bir sürece ihtiyaç olduğunu görülmüştür ve bundan dolayı 21 günlük mineralizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

Mineralizasyon analizleri için doku iskelelerine osteojenik farklılaşma ortamına alındıktan sonra 21 gün boyunca günde 30 dakika olmak üzere 1 N ve 2 N'luk mekanik yük uygulanmıştır. Şekil 3.24'te Alizarin Kırmızı S boyası ile boyanmış doku iskelelerinin görüntüleri verilmiştir. Inverted mikroskoptan alınan görüntüler incelendiği zaman mekanik yük uygulanan doku iskelelerindeki renk yük uygulanmayan numunelere göre daha koyudur. Hiç hücre ekilmemiş doku iskelelerinde ise herhangi bir renk görünmemektedir. Bu da renklenmenin olduğu numunelerde minerallerin varlığını göstermektedir. Oluşan kalsiyum minerallerini kantitatif olarak değerlendirmek için doku iskelelerinden mineral ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu ekstraksiyonların süpernatantları 570 nm'de mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar yüksüz doku iskelelerinin sonuçlarına bölünerek normalize edilmiştir. BCS50 doku iskelesi hariç diğer doku iskelelerinde artan yüklerle birlikte mineral miktarının da arttığı görülmüştür. BCS50 doku iskelesinde ise 1 N ve 2 N yük altında elde edilen sonuçlar birbirine yakın çıkmıştır. En yüksek mineral miktarının 2 N yük altında BCC75 doku iskelesinde olduğu tespit edilmiştir. BCC75 doku iskelesi en yüksek spesifik yüzey alanına sahip doku iskelesidir. Bu da spesifik yüzey alanının doku iskelesi uygulamalarında önemli bir yere sahip olduğunun göstergesidir.

Mikro-BT analizleri de mineralizasyon analizinde izlenen yöntemle aynı şekilde %50 ve %75 gözenek oranına sahip BCS ve BCC doku iskelelerinde osteojenik farklılaşma medium'u eklendikten sonra 21 gün boyunca günde 30 olmak üzere 1 N ve 2 N mekanik yük uygulanarak gerçekleştirilmiştir. 21 günün sonunda doku iskeleleri %10'luk formalin ile fiksasyon işlemi yapıldıktan sonra mikro-BT taraması yapılmıştır. Mikro-BT görüntüleri incelendiği zaman BCS75 doku iskelesinin hasara uğradığı gözlemlenmiştir. Bunun dışındaki doku iskelelerinde ise hasar gözlemlenmemiştir. Mikro-BT taramalarında doku iskeleleri filtrelendikten sonra mineral miktarını belirleyebilmek için görüntü işleme yönteminden yararlanılmıştır. Görüntü işleme yöntemi kullanılarak mineralleri temsil eden piksel sayıları

çıkarılmıştır. Yüklü durumdaki doku iskelelerindeki piksel sayıları yüksüz doku iskelelerindeki piksel sayılarına bölünerek normalize edilmiştir. Mikro-BT taramasından elde edilen normalize piksel sayılarını veren grafik Şekil 3.27’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar mineralizasyon analizinden elde edilen sonuçlarla uyumlu çıkmıştır. Mikro-BT analizinde de BCS50 doku iskelesi hariç artan yüklerle birlikte oluşan mineral miktarının arttığı tespit edilmiştir. En yüksek değer BCS75 doku iskelesindedir. BCS75 doku iskelesi en yüksek spesifik enerji emilimi değerine sahip doku iskelesidir. İkinci sırada en yüksek değere sahip olan doku iskelesi ise BCC75 doku iskelesidir. BCC75 doku iskelesi ise en yüksek ikinci spesifik enerji emilimi değerine ve en yüksek spesifik yüzey alanı değerine sahip doku iskelesidir. In vitro analizlerden elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir.

- Canlılık analizi sonuçlarına göre mekanik yükün BC doku iskelelerinde olumlu bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bunun temel nedeninin BC doku iskelesinin sadece yatay ve dikey çubuklardan oluşması olduğu düşünülmektedir. Bu doku iskelesinde yer çekimi etkisi altında hücrelerin tutunmasının diğer doku iskelelerine göre daha zor olması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca BC doku iskeleleri diğer doku iskelelerinden daha yüksek rijitlik değerine sahip olduğu için spesifik enerji emilimi değerleri de daha düşüktür. Bundan dolayı mineralizasyon ve mikro-BT analizlerinde BC doku iskeleleri kullanılmamıştır.
- ALP enzim aktiviteleri osteojenik farklılaşma medium’u eklendikten 7 gün sonra ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlarına göre tüm doku iskelelerinde mekanik yükün anlamlı bir farklılık oluşturmadığı görülmüştür. Bundan dolayı daha uzun süreli (21 gün) mineralizasyon ve mikro-BT analizleri gerçekleştirilmiştir.
- Osteojenik farklılaşma medium’u eklendikten 21 gün sonra %50 ve %75 gözenek oranına sahip BCS ve BCC doku iskelelerine mineralizasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar yüksüz doku iskelesinden elde edilen sonuçlara oranlanarak normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlara göre BCC50 ve BCC75 doku iskelelerinde artan mekanik yüklerle birlikte mineral oluşumunun da arttığı gözlemlenmiştir. BCC50 doku iskelesinin sonuçları incelendiği zaman 1 N mekanik yükün mineral oluşumu üzerine etkisi olmadığı görülmektedir. Benzer sonuçlar BCS75 doku iskelesinden de

alınmıştır. Fakat BCS50 doku iskelesinde elde edilen sonuçlar beklenenin aksi yönünde çıkmıştır.

- Mikro-BT analizleri de mineralizasyon analizleri gibi osteojenik farklılaşma medium'u eklendikten 21 gün sonra 1 N ve 2 N mekanik yük etkisi altında %50 ve %75 gözenek oranına sahip BCS ve BCC doku iskeleleri için gerçekleştirilmiştir. Mikro-BT analizlerinde mineral miktarları görüntü işleme yöntemiyle belirlenmiştir. Yüklü durumdaki değerler yüksüz durumdaki değerlerle orantılanarak normalize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar mineralizasyon analizinden elde edilen sonuçlarla benzer şekilde çıkmış olup BCS50 doku iskelesi hariç artan mekanik yükün mineral oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir.

Kemik doku iskelelerinin tasarım parametrelerini nümerik olarak da değerlendirebilmek için in silico model tasarlanmıştır. Bu in silico model sonlu elemanlar yöntemine dayanmaktadır. Mekanik yük etkisi altında doku iskelesinden gerilme ve birim şekil değiştirme değerleri alındıktan sonra bu çıktılar Bölüm 2.8'de anlatılmış olan kemik yapılanma modelinde kullanılmaktadır. Denklem 2.16 ile tanımlanan kemik yapılanma modeli iki adet katsayı içermektedir. Bu katsayılar B ve k olup doğrudan kemik rejenerasyonunu etkileyecek katsayılardır. Bu katsayıları belirleyebilmek için in vitro analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde mekanik yük etkisi altında hücre canlılığı ve ALP enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Fakat elde edilen sonuçlarla in silico modelde kullanılan katsayılar belirlenememiştir. Daha sonra 21 günlük mineralizasyon ve mikro-BT analizleri gerçekleştirilmiş olup elde edilen sonuçlar kontrol grubu değerlerine normalize edilerek hem birbirleriyle kıyaslanabilir hale hem de in silico model sonuçlarıyla kıyaslanabilir hale getirilmiştir. Kemik yapılanma modelindeki katsayıları belirlemek için mineralizasyon ve mikro-BT analizlerindeki yükleme şartlarının aynısı in silico modele de tanımlanmış ve bir dizi parametrik simülasyonlar gerçekleştirilerek ve sonuçları normalize edilmiş mineralizasyon ve mikro-BT sonuçlarıyla kıyaslanarak kemik yapılanma modelindeki katsayılar belirlenmiştir. Bu katsayılar $B = 25000 ((g\ cm^{-3})^2 (MPa \times time\ unit)^{-1})$ ve $k = 4e - 10\ J/g$ olarak belirlenmiştir. Bu modelle doku iskelelerinin in silico simülasyonları 21 güne karşılık gelecek şekilde 21 çevrim olarak günde 30 dakika boyunca 1 N ve 2 N mekanik yük altında çalıştırılmıştır. In silico modelden elde edilen normalize edilmiş sonuçlar

incelendiğinde en yüksek sonuçların 2 N yük altında %75 gözenek oranına sahip olan doku iskelelerinde olduğu gözlemlenmiştir.

BCS doku iskeleleri diğer doku iskelelerine göre daha düşük rijitlik değerine sahip oldukları için daha fazla şekil değiştirme enerjisine sahiptirler ve bundan dolayı da BCS doku iskelelerindeki kemikleşme oranları diğer doku iskelelerinden daha yüksektir. Fakat hem basma simülasyonlarından alınan sonuçlarda hem de in vitro analizlerden alınan sonuçlara göre özellikle BCS75 doku iskelesi hasara uğramaktadır. İkinci sırada ise BCS50 doku iskelesi gelmektedir. Bunun ana nedeni ise açılı çubukların birleşim bölgelerinde daha yüksek gerilme değerlerinin olması ve bu bölgelerde nümerik modele göre daha fazla kemik yoğunluğu artışının olması söylenebilir. BCC75 doku iskelesi ise üçüncü en yüksek değere sahip doku iskelesidir. BCC75 doku iskelesi hem en yüksek spesifik yüzey alanına hem de en yüksek ikinci spesifik enerji emilimi değerine sahiptir. Ayrıca deneyler esansında da uygulanan mekanik yükler altında hasara uğramadığı da gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında mekanik yük etkisi altında farklı tasarım parametrelerine (gözenek geometrisi ve oranı) sahip kemik doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilirliği ve tasarım parametrelerinin kemik doku iskelelerinden beklenen özellikler üzerine etkisi 3 ana başlık altında hem deneysel hem de nümerik olarak incelenmiştir. Bunlar

- Mekanik özellikler
- Biyobozunma özellikleri
- Kemik rejenerasyonu

olarak sıralanabilir.

Tez kapsamında yapılan tüm çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre gözenek geometrisi ve oranı gibi farklı tasarım parametrelerinin doku iskelelerinin başarısı üzerine çok önemli etkilerinin olduğu görülmüştür. Bu tasarım parametreleri doğrudan spesifik enerji emilimini ve spesifik yüzey alanını etkilemektedir. Yapılan analizlerin sonucunda da bu değerlerin yüksek olduğu doku iskeleleri daha olumlu sonuçlara sahiptir. Ayrıca in vitro analizlerden elde edilen kemik yapılanma modelindeki katsayılarla in silico modelde çok çeşitli doku iskelesi tasarımları denenebilecektir. Bu da daha başarılı doku iskelesi tasarımları gerçekleştirmek için oldukça önemlidir. Yapılan in vitro analizler statik yükleme altında yapılmıştır. Fakat kemik doku

iskelelerinin kullanım yerlerinde dinamik yüklemelere de maruz kalacağı düşünülmektedir. Bundan dolayı bu analizlerin dinamik yükleme altında da gerçekleştirilip sonuçlarının statik yükleme sonuçlarıyla kıyaslanması önemli sonuçlar verecektir. Ayrıca yapılan 120 günlük biyobozunma deneylerinde mekanik özelliklerde kayda değer değişimler gözlemlenmemiştir. Bu da ilk 120 günde biyobozunmanın ilk aşamayı geçmediğinin göstergesidir. İkinci aşamada gözlemlenmesi için daha uzun süreli biyobozunma deneylerinin yapılması ve özellikle ilk nümerik model olan birinci dereceden kinetik modelin bu bölgeyi doğru bir şekilde simüle edip edemeyeceğinin tespit edilmesi de önemli sonuçlar verecektir.



KAYNAKLAR

- [1] **Peterson, D. R., Bronzino, J. D. (Eds.).** (2015). *The biomedical engineering handbook*. Crc Press.
- [2] **Tabata, Y.** (2009). Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society Interface*, 6(suppl_3), S311-S324.
- [3] **Langer, R., Vacanti, J. P.** (1993). Tissue Engineering, *Science*, 260, 920-926.
- [4] **Çakmak, S.** (2015). Kemik Doku Onarımı İçin Hidroksiapatit Peptit Amfil Bazlı Nanokompozit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Ana Bilim Dalı, 200, Ankara
- [5] **Göz E.** (2014). Büyüme Faktörlerini Sıralı Salan Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi Ve Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- [6] **Peyroteo, M. M. A., Belinha, J., Vinga, S., Dinis, L. M. J. S., Jorge, R. N.** (2019). Mechanical bone remodelling: Comparative study of distinct numerical approaches. *Engineering Analysis with Boundary Elements*, 100, 125-139.
- [7] **Isaksson, H.** (2012). Recent advances in mechanobiological modeling of bone regeneration. *Mechanics Research Communications*, 42, 22-31.
- [8] **Adachi, T., Osako, Y., Tanaka, M., Hojo, M., Hollister, S. J.** (2006). Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. *Biomaterials*, 27(21), 3964-3972.
- [9] **Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., Grigolo, B.** (2017). Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1246-1262.
- [10] **Li, J., Li, H., Shi, L., Fok, A. S., Ucer, C., Devlin, H., Silikas, N.** (2007). A mathematical model for simulating the bone remodeling process under mechanical stimulus. *Dental Materials*, 23(9), 1073-1078.
- [11] **Pearce, C. J.** (2011). Efficient numerical analysis of bone remodelling. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(6), 858-867.
- [12] **Milan, J. L., Planell, J. A., Lacroix, D.** (2010). Simulation of bone tissue formation within a porous scaffold under dynamic compression. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 9, 583-596.
- [13] **Park, Y. J., Lee, Y. M., Park, S. N., Sheen, S. Y., Chung, C. P., Lee, S. J.** (2000). Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, 21(2), 153-159.
- [14] **Park, Y.J., Lee, Y.M., Lee, J.Y., Seol Y.J., Chung, C.P., Lee, S.J.** (2000). Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *Journal of Controlled Release*, 67, 385-394.

- [15] **Holland, T. A., Tabata, Y., Mikos, A. G.** (2003). In vitro release of transforming growth factor- β 1 from gelatin microparticles encapsulated in biodegradable, injectable oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 91(3), 299-313.
- [16] **De la Riva, B., Sánchez, E., Hernández, A., Reyes, R., Tamimi, F., López-Cabarcos, E., Delgado, A., Évora C.** (2010). Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite-chitosan system enhances bone regeneration. *Journal of Controlled Release*, 143; 45-52.
- [17] **Peter, M., Ganesh, N., Selvamuragan, N., Nair S.V., Furuike, T., Tamura, H., Jayakumar, R.** (2010). Preparation and characterization of chitosangelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 80; 687-694.
- [18] **Kanczler, J.M., Ginty, P.J., White, L., Clarke, N.M.P, Howdle, S.M., Shakesheff, K.M., Oreffo, R.O.C.** (2010). The effect of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 on osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials*, 21, 1242-1250.
- [19] **Huang, W., Shi, X., Rem, L., Du, C., Wang, Y.** (2010). PHBV microspheres-PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31, 4278-4285.
- [20] **Mendonça, R.H., Meiga, T., Costa, M., Thire, R.** (2012). Production of 3D scaffolds applied to tissue engineering using chitosan swelling as a porogenic agent. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(2), 614-625.
- [21] **Kavya, K.C., Jauakumar, R., Nair, S., Chennazhi, K.P.** (2013). Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 255-263.
- [22] **Özer, G.** (2020). Eklemeli üretim teknolojileri üzerine bir derleme. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 9(1), 606-621.
- [23] **Aldemir B.** (2016). Development, Production and Characterization of Ceramic Based 3D Tissue Scaffolds. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojileri Anabilim Dalı, 97, İzmir.
- [24] **Wong, K. V., Hernandez, A.** (2012). A review of additive manufacturing. *International Scholarly Research Notices*, 2012(1), 208760.
- [25] **Krar, S. F., Gill, A.** (2003). *Exploring Advanced Manufacturing Technologies*. Industrial Press Inc.
- [26] **Hutmacher, D. W., Sittinger, M., Risbud, M. V.** (2004). Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *TRENDS in Biotechnology*, 22(7), 354-362.
- [27] **Hasan, M. H., Sagor, J. A., Agarwala, I.** (2022). A systematic trend analysis of 3D printing techniques used in specific soft robotic elements. *Materials Today: Proceedings*, 50, 1088-1099.
- [28] **Upcraft, S., Fletcher, R.** (2003). The rapid prototyping technologies. *Assembly Automation*, 23(4), 318-330.
- [29] **Morgan, E. F., Gerstenfeld, L. C.** (2021). The bone organ system: form and function. In *Marcus and Feldman's Osteoporosis* (pp. 15-35). Academic Press.

- [30] **Url-1** <<https://www.slideserve.com/tori/skeletal-system-overview>>, erişim tarihi 05.11.2024.
- [31] **Çetin D.** (2010). Poli (2- Hidroksietil Metakrilat) Bazlı Süper Gözenekli Doku İskeleleri ile Kemik Rejenerasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi.
- [32] **Bolamperti, S., Villa, I., Rubinacci, A.** (2022). Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Research*, 10(1), 48.
- [33] **Szadek, L. L., Scharer, K.** (2014). Identification, prevention, and treatment of children with decreased bone mineral density. *Journal of Pediatric Nursing*, 29(5), e3-e14.
- [34] **Scaffaro, R., Lopresti, F., Botta, L., Rigogliuso, S., Gherzi, G.** (2016). Integration of PCL and PLA in a monolithic porous scaffold for interface tissue engineering *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 63, 303-313.
- [35] **Hutmacher, D. W.** (2000). “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage”. *Biomaterials*, 21(24), 2529-2543.
- [36] **Baptista, R., Guedes, M.** (2021). Morphological and mechanical characterization of 3D printed PLA scaffolds with controlled porosity for trabecular bone tissue replacement. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111528.
- [37] **Tripathi, G., Basu, B.** (2012). “A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations”, *Ceramics International*, 38(1), 341-349.
- [38] **Zhang, B., Pei, X., Zhou, C., Fan, Y., Jiang, Q., Ronca, A., Zhang, X.** (2018). The biomimetic design and 3D printing of customized mechanical properties porous Ti6Al4V scaffold for load-bearing bone reconstruction, *Materials & Design*, 152, 30-39.
- [39] **Patel, P. P., Buckley, C., Taylor, B. L., Sahyoun, C. C., Patel, S. D., Mont, A. J., Freeman, J. W.** (2019). Mechanical and biological evaluation of a hydroxyapatite-reinforced scaffold for bone regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(4), 732-741.
- [40] **Jaecques, S. V. N., Van Oosterwyck, H., Muraru, L., Van Cleynenbreugel, T., De Smet, E., Wevers, M., Vander Sloten, J.** (2004). Individualised, micro CT-based finite element modelling as a tool for biomechanical analysis related to tissue engineering of bone. *Biomaterials*, 25(9), 1683-1696.
- [41] **Lacroix, D., Chateau, A., Ginebra, M. P., Planell, J. A.** (2006). Micro-finite element models of bone tissue-engineering scaffolds, *Biomaterials*, 27(30), 5326-5334.
- [42] **Askari, E., Cengiz, I. F., Alves, J. L., Henriques, B., Flores, P., Fredel, M. C., Mesquita-Guimarães, J.** (2020). Micro-CT based finite element modelling and experimental characterization of the compressive mechanical properties of 3-D zirconia scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 102, 103516.
- [43] **Bashkuev, M., Checa, S., Postigo, S., Duda, G., Schmidt, H.** (2015). Computational analyses of different intervertebral cages for lumbar spinal fusion, *Journal of Biomechanics*, 48(12), 3274-3282.

- [44] Lin, C. Y., Kikuchi, N., Hollister, S. J. (2004). A novel method for biomaterial scaffold internal architecture design to match bone elastic properties with desired porosity, *Journal of Biomechanics*, 37(5), 623-636.
- [45] Kang, H., Lin, C. Y., Hollister, S. J. (2010). Topology optimization of three dimensional tissue engineering scaffold architectures for prescribed bulk modulus and diffusivity, *Structural and Multidisciplinary Optimization*, 42(4), 633-644.
- [46] Imanlou, B. (2016). *A topology optimized model based on the level-set method for porous bone scaffolds* (Doktora Tezi).
- [47] Zaky, S. H., Lee, K. W., Gao, J., Jensen, A., Verdelis, K., Wang, Y., Sfeir, C. (2017). Poly (glycerol sebacate) elastomer supports bone regeneration by its mechanical properties being closer to osteoid tissue rather than to mature bone. *Acta Biomaterialia*, 54, 95-106.
- [48] Boccaccio, A., Uva, A. E., Fiorentino, M., Lamberti, L., Monno, G. (2016). A mechanobiology-based algorithm to optimize the microstructure geometry of bone tissue scaffolds, *International Journal of Biological Sciences*, 12(1), 1.
- [49] Rodríguez-Montaña, Ó. L., Cortés-Rodríguez, C. J., Uva, A. E., Fiorentino, M., Gattullo, M., Monno, G., Boccaccio, A. (2018). Comparison of the mechanobiological performance of bone tissue scaffolds based on different unit cell geometries. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 83, 28-45.
- [50] Chen, Y., Zhou, S., Li, Q. (2011a). Mathematical modeling of degradation for bulk-erosive polymers: applications in tissue engineering scaffolds and drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1140-1149.
- [51] Chen, Y., Zhou, S., Li, Q. (2011b). Microstructure design of biodegradable scaffold and its effect on tissue regeneration. *Biomaterials*, 32(22), 5003-5014.
- [52] Jin, H., Zhuo, Y., Sun, Y., Fu, H., Han, Z. (2019). Microstructure design and degradation performance in vitro of three-dimensional printed bioscaffold for bone tissue engineering. *Advances in Mechanical Engineering*, 11(10), 1687814019883784.
- [53] Li, X., Chu, C., Wei, Y., Qi, C., Bai, J., Guo, C., Chu, P. K. (2017). In vitro degradation kinetics of pure PLA and Mg/PLA composite: Effects of immersion temperature and compression stress. *Acta biomaterialia*, 48, 468-478.
- [54] Li, X., Qi, C., Han, L., Chu, C., Bai, J., Guo, C., Chu, P. K. (2017). Influence of dynamic compressive loading on the in vitro degradation behavior of pure PLA and Mg/PLA composite. *Acta biomaterialia*, 64, 269-278.
- [55] Shi, Q., Chen, Q., Pugno, N., Li, Z. Y. (2018). Effect of rehabilitation exercise durations on the dynamic bone repair process by coupling polymer scaffold degradation and bone formation. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 17(3), 763-775.
- [56] Shui, H., Shi, Q., Pugno, N. M., Chen, Q., Li, Z. (2019). Effect of mechanical stimulation on the degradation of poly (lactic acid) scaffolds with different designed structures. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 96, 324-333.
- [57] Shi, Q., Shui, H., Chen, Q., Li, Z. Y. (2020). How does mechanical stimulus affect the coupling process of the scaffold degradation and bone

- formation: An in silico approach. *Computers in Biology and Medicine*, 117, 103588.
- [58] Gregor, A., Filová, E., Novák, M., Kronek, J., Chlup, H., Buzgo, M., Hošek, J. (2017). Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *Journal of Biological Engineering*, 11(1), 31.
- [59] Url-2 <<https://www.youtube.com/watch?v=C6X9Ry02mPU&t=258s>>, erişim tarihi 05.11.2024.
- [60] Chandrupatla, T., Chandrupatla, T. R., Belegundu, A. (2021). Introduction to finite elements in engineering. *Cambridge University Press*.
- [61] Li, X. (2011). Investigation into spongy bone remodeling through a semi-mechanistic bone remodeling theory using finite element analysis (Doctoral dissertation, University of Ottawa (Canada)).
- [62] Eidel, B., Gote, A., Ohrndorf, A., Christ, H. J. (2018). How can a short stem hip implant preserve the natural, pre-surgery force flow? A finite element analysis on a collar cortex compression concept (CO4). *Medical Engineering & Physics*, 58, 1-12.
- [63] Chen, H., Shi, Q., Shui, H., Wang, P., Chen, Q., Li, Z. (2021). Degradation of 3D-printed porous polylactic acid scaffolds under mechanical stimulus. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 691834.
- [64] Elmowafy, E. M., Tiboni, M., Soliman, M. E. (2019). Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly (lactic acid)/poly (lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 49, 347-380.
- [65] Şenaysoy, S., Lekesiz, H. (2024). Evaluation Of Mechanobiological Potential Of 3d-Printed PLA Bone Tissue Scaffolds With Different Pore Architectures And Porosity Ratios. *International Journal of 3D Printing Technologies and Digital Industry*, 8(2), 173-184. <https://doi.org/10.46519/ij3dptdi.1449545>
- [66] Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288 (2), 369-376.
- [67] Melo, P.S., de Medeiros Cavalcante, H.M., Barbosa-Filho, J.M., de Fátima Formiga Melo Diniz, M., de Medeiros, I.A., Haun, M. (2003). Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. *Toxicology Letters*, 142 (1-2), 143-151.
- [68] Kenar, H., Köse, G. T., Hasirci, V. (2006). Tissue engineering of bone on micropatterned biodegradable polyester films, *Biomaterials*, 27, 885-895.
- [69] Pullisaar, H., Verket, A., Szoke, K., Tiainen, H., Haugen, H. J., Brinchmann, J. E., Østrup, E. (2015). Alginate hydrogel enriched with enamel matrix derivative to target osteogenic cell differentiation in TiO₂ scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*, 6, 2041731415575870.
- [70] Subramaniam, M., Jalal, S. M., Rickard, D. J., Harris, S. A., Bolander, M. E., Spelsberg, T. C. (2002). Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER α cells: Bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. *Journal of Cellular Biochemistry*, 87(1), 9-15.

- [71] Lin, X., Patil, S., Gao, Y. G., Qian, A. (2020). The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 757.
- [72] Tavafoghi, M., Cerruti, M. (2016). The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. *Journal of The Royal Society Interface*, 13(123), 20160462.
- [73] DesMarais, V., Eddy, R. J., Sharma, V. P., Stone, O., Condeelis, J. S. (2019). Optimizing leading edge F-actin labeling using multiple actin probes, fixation methods and imaging modalities. *BioTechniques*, 66(3), 113-119.
- [74] Cooper, G. M. (2000). Structure and organization of actin filaments. *The cell: a molecular approach*, 2.
- [75] Abdelmagid, S. M., Barbe, M. F., Rico, M. C., Salihoglu, S., Arango-Hisijara, I., Selim, A. H., Safadi, F. F. (2008). Osteoactivin, an anabolic factor that regulates osteoblast differentiation and function. *Experimental Cell Research*, 314(13), 2334-2351.
- [76] Morsi, N. M., Shamma, R. N., Eladawy, N. O., Abdelkhalek, A. A., Enriched, R. L. M. G. F. (2019). with Nanohydroxyapatite: Preparation, Characterization, and Osteogenic Activity Evaluation Using Saos-2 Cells. *AAPS PharmSciTech*, 104, 1-16.
- [77] Chai, X., Zhang, W., Chang, B., Feng, X., Song, J., Li, L., Si, H. (2019). GPR39 agonist TC-G 1008 promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 3569-3576.
- [78] Mechiche Alami, S., Gangloff, S. C., Laurent-Maquin, D., Wang, Y., Kerdjoudj, H. (2016). Concise review: in vitro formation of bone-like nodules sheds light on the application of stem cells for bone regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(11), 1587-1593.
- [79] Bernar, A., Gebetsberger, J. V., Bauer, M., Streif, W., Schirmer, M. (2022). Optimization of the alizarin red S assay by enhancing mineralization of osteoblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 723.
- [80] Belaid, H., Nagarajan, S., Teyssier, C., Barou, C., Barés, J., Balme, S., Bechelany, M. (2020). Development of new biocompatible 3D printed graphene oxide-based scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 110, 110595.
- [81] Kim, Y., Brodt, M. D., Tang, S. Y., Silva, M. J. (2021). MicroCT for scanning and analysis of mouse bones. *Skeletal Development and Repair: Methods and Protocols*, 169-198.
- [82] Swain, M. V., Xue, J. (2009). State of the art of Micro-CT applications in dental research. *International Journal of Oral Science*, 1(4), 177-188.
- [83] Qiu, Y., Tang, C., Serrano-Sosa, M., Hu, J., Zhu, J., Tang, G., Huang, M. (2019). Bone microarchitectural parameters can detect oxytocin induced changes prior to bone density on mitigating bone deterioration in rabbit osteoporosis model using micro-CT. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 20, 1-9.
- [84] Frost, H. M. (1996). Perspectives: A proposed general model of the “mechanostat”(suggestions from a new skeletal-biologic paradigm). *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 244(2), 139-147.

- [85] Weinans, H., Huiskes, R., Grootenboer, H. J. (1992). The behavior of adaptive bone-remodeling simulation models. *Journal of Biomechanics*, 25(12), 1425-1441.
- [86] Gibson, L. J. (2003). Cellular solids. *Mrs Bulletin*, 28(4), 270-274.
- [87] Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.
- [88] Tovar, N., Witek, L., Atria, P., Sobieraj, M., Bowers, M., Lopez, C. D., Coelho, P. G. (2018). Form and functional repair of long bone using 3D-printed bioactive scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(9), 1986-1999.
- [89] Wu, L., Ding, J. (2005). Effects of porosity and pore size on in vitro degradation of three-dimensional porous poly (D, L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 75(4), 767-777.
- [90] Shuai, C., Yang, W., Feng, P., Peng, S., Pan, H. (2021). Accelerated degradation of HAP/PLLA bone scaffold by PGA blending facilitates bioactivity and osteoconductivity. *Bioactive Materials*, 6(2), 490-502.
- [91] do Amaral Montanheiro, T. L., Montagna, L. S., Patrúlea, V., Jordan, O., Borchard, G., Ribas, R. G., Lemes, A. P. (2019). Enhanced water uptake of PHBV scaffolds with functionalized cellulose nanocrystals. *Polymer Testing*, 79, 106079.
- [92] Radakisnin, R., Abdul Majid, M. S., Mohd Jamir, M. R., Mat Tahir, M. F., Meng, C. E., Al Shahrani, H. (2021). Physical, thermal, and mechanical properties of highly porous polylactic acid/cellulose nanofibre scaffolds prepared by salt leaching technique. *Nanotechnology Reviews*, 10(1), 1469-1483.
- [93] Sultana, N., Khan, T. H. (2013). Water absorption and diffusion characteristics of nanohydroxyapatite (nHA) and poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate-) based composite tissue engineering scaffolds and nonporous thin films. *Journal of Nanomaterials*, 2013(1), 479109.
- [94] Zhang, Q., Jiang, Y., Zhang, Y., Ye, Z., Tan, W., Lang, M. (2013). Effect of porosity on long-term degradation of poly (ϵ -caprolactone) scaffolds and their cellular response. *Polymer Degradation and Stability*, 98(1), 209-218.
- [95] Zhou, J., Xiong, S., Liu, M., Yang, H., Wei, P., Yi, F., Xiong, L. (2023). Study on the influence of scaffold morphology and structure on osteogenic performance. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1127162.
- [96] Yang, Y., Zhao, Y., Tang, G., Li, H., Yuan, X., Fan, Y. (2008). In vitro degradation of porous poly (l-lactide-co-glycolide)/ β -tricalcium phosphate (PLGA/ β -TCP) scaffolds under dynamic and static conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 93(10), 1838-1845.
- [97] Bejarano, J., Boccaccini, A. R., Covarrubias, C., Palza, H. (2020). Effect of Cu- and Zn-doped bioactive glasses on the in vitro bioactivity, mechanical and degradation behavior of biodegradable PDLA scaffolds. *Materials*, 13(13), 2908.

- [98] **Jiang, D., Ning, F., Wang, Y.** (2021). Additive manufacturing of biodegradable iron-based particle reinforced polylactic acid composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Processing Technology*, 289, 116952.
- [99] **Ilhan, R., Senaysoy, S., Lekesiz, H.** (2022). Experimental and Numerical Investigation of Short-Term Bio-Degradation Behavior of 3D Printed PLA. In *International Manufacturing Science and Engineering Conference (Vol. 85802, p. V001T02A001)*. American Society of Mechanical Engineers.
- [100] **McKenna, E., Klein, T. J., Doran, M. R., Futrega, K.** (2019). Integration of an ultra-strong poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) knitted mesh into a thermally induced phase separation (TIPS) PLGA porous structure to yield a thin biphasic scaffold suitable for dermal tissue engineering. *Biofabrication*, 12(1), 015015.



EKLER

EK A: 3 Boyutlu Sonlu Elemanlar Teorisi

EK B: 3 Boyutlu Sonlu Elemanlar Kodlarının MATLAB Ortamında Oluşturulması

EK C: Difüzyon Esaslı Biyobozunma Modelinin MATLAB Ortamında Çözümü

EK D: Kemik Yeniden Yapılanma Modelinin MATLAB Ortamında Çözümü

EK E: Periyodik Doku İskelelerinin Von Mises Gerilme ve Eş Değer Birim Şekil Değişirme Dağılımları

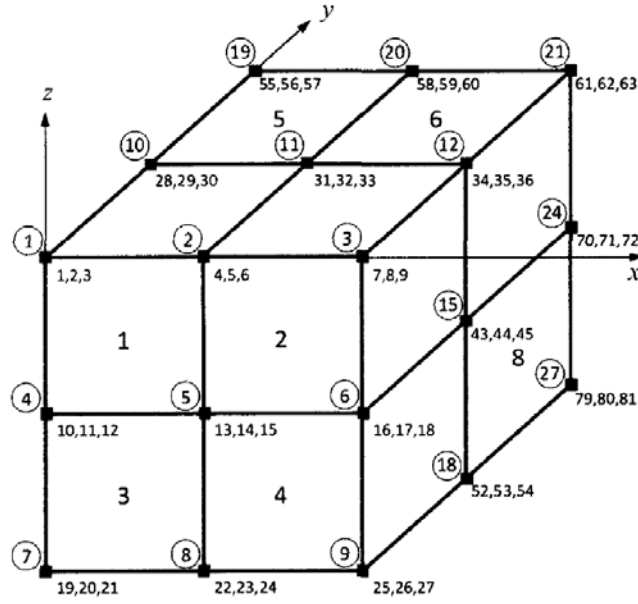
EK F: Birinci Dereceden Kinetik Biyobozunma Modelinden Elde Edilen Malzeme Özelliklerine Göre Periyodik Doku İskelelerinin 4 N Yük Altında Von Mises Gerilme, Toplam Yer Değişirme ve Eş Değer Birim Şekil Değişirme Dağılımları

EK G: Periyodik Doku İskelelerinin Difüzyon Esaslı Biyobozunma Modelinden Elde Edilen Su Konsantrasyonu, Moleküler Ağırlık ve Elastisite Modülü Dağılımları

EK A

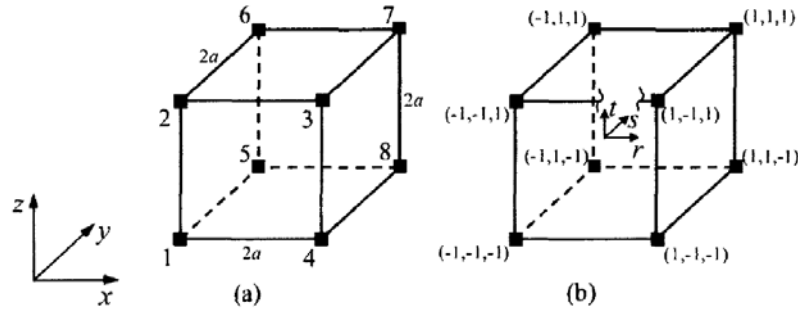
1. 3 Boyutlu Sonlu Elemanlar Teorisi

3 boyutlu sonlu elemanlar programında 8 düğüm noktasına sahip küp elemanlar kullanılmıştır. Şekil 1’ de sonlu elemanlar analizinde kullanılan 3 boyutlu geometrinin meshleri ve düğüm noktaları verilmiştir. Her bir düğüm noktası 3 adet serbestlik derecesine ve 8 düğüm noktalı her bir eleman 24 serbestlik derecesine sahiptir.



Şekil A.1: 3 boyutlu geometri için kullanılan küp elemanlar ve düğüm noktaları.

8 düğüm noktalı küp elemanın düğüm noktalarının yerleşimi Şekil A.2a’ da görüldüğü gibidir.



Şekil A.2: 8 düğüm noktalı küp eleman a) global kartezyen koordinatlar b) orijin noktası merkezde bulunan yerel koordinatlar.

Burada Şekil A.2b’ de görülen r , s , ve t yerel koordinatlar olarak kullanılmıştır. Yerel koordinat takımının orijin noktası küpün merkezindedir.

$$r = \frac{x - \bar{x}}{a}, \quad s = \frac{y - \bar{y}}{a}, \quad t = \frac{z - \bar{z}}{a} \quad (\text{A.1})$$

Burada 2a küpün bir kenar uzunluğudur. Elemanın merkezinin koordinatları

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_4}{2}, \quad \bar{y} = \frac{y_1 + y_5}{2}, \quad \bar{z} = \frac{z_1 + z_2}{2} \quad (\text{A.2})$$

dır. Burada yerel koordinatlar olan r , s ve t Şekil 2b' de görüldüğü gibi -1 veya +1 değerlerini almaktadır.

2. Şekil Fonksiyonları Matrisi [N]

Şekil A.2b' deki elemanın 8 düğüm noktasına karşılık gelen şekil fonksiyonları aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$\begin{aligned} N_1 &= \frac{1}{8} (1 - r)(1 - s)(1 - t) \\ N_2 &= \frac{1}{8} (1 - r)(1 - s)(1 + t) \\ N_3 &= \frac{1}{8} (1 + r)(1 - s)(1 + t) \\ N_4 &= \frac{1}{8} (1 + r)(1 - s)(1 - t) \\ N_5 &= \frac{1}{8} (1 - r)(1 + s)(1 - t) \\ N_6 &= \frac{1}{8} (1 - r)(1 + s)(1 + t) \\ N_7 &= \frac{1}{8} (1 + r)(1 + s)(1 + t) \\ N_8 &= \frac{1}{8} (1 + r)(1 + s)(1 - t) \end{aligned} \quad (\text{A.3})$$

Burada (r, s, t) Şekil A.2b' deki elemanın yerel koordinatlarıdır. Şekil A.2a'daki global koordinatları aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$x = \sum_{i=1}^8 N_i(r, s, t)x_i, \quad y = \sum_{i=1}^8 N_i(r, s, t)y_i, \quad z = \sum_{i=1}^8 N_i(r, s, t)z_i \quad (\text{A.4})$$

Global koordinatlarda küp eleman içerisindeki bir noktanın yer değiştirmeleri aşağıdaki şekilde yazılabilir.

$$\begin{aligned}
u(x, y, z) &= \sum_{i=1}^8 N_i(r, s, t)u_i, & v(x, y, z) &= \sum_{i=1}^8 N_i(r, s, t)v_i, \\
w(x, y, z) &= \sum_{i=1}^8 N_i(r, s, t)w_i
\end{aligned}
\tag{A.5}$$

Burada u , v ve w global x , y ve z doğrultularındaki bir noktanın (x, y, z) yer değiştirmeleridir. u_i, v_i ve w_i ($i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ ve 8) Şekil A.2a'daki elemanın her bir dđđüm noktasının yer değiştirmeleridir. Matris formda elemanın yer değiştirme fonksiyonu Şu Şekilde yazılabilir.

$$\begin{Bmatrix} u(x, y, z) \\ v(x, y, z) \\ w(x, y, z) \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} N_1 & 0 & 0 & N_2 & 0 & 0 & \dots & N_8 & 0 & 0 \\ 0 & N_1 & 0 & 0 & N_2 & 0 & \dots & 0 & N_8 & 0 \\ 0 & 0 & N_1 & 0 & 0 & N_2 & \dots & 0 & 0 & N_8 \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} u_1 \\ v_1 \\ w_1 \\ u_2 \\ v_2 \\ w_2 \\ \vdots \\ u_8 \\ v_8 \\ w_8 \end{Bmatrix}
\tag{A.6}$$

Denklem A.6 daha sade halde Şu Şekilde ifade edilebilir.

$$\begin{Bmatrix} u \\ v \\ w \end{Bmatrix} = [N]\{u^e\}
\tag{A.7}$$

Burada

$$[N] = \begin{bmatrix} N_1 & 0 & 0 & N_2 & 0 & 0 & \dots & N_8 & 0 & 0 \\ 0 & N_1 & 0 & 0 & N_2 & 0 & \dots & 0 & N_8 & 0 \\ 0 & 0 & N_1 & 0 & 0 & N_2 & \dots & 0 & 0 & N_8 \end{bmatrix}
\tag{A.8}$$

Şekil fonksiyonudur. $\{u^e\}$ Şekil 2a' daki 8 dđđüm noktalı elemanın dđđüm noktası yer değiştirme vektörüdür.

3. Jakobiyen Matrisi [J]

Jakobiyen matrisi

$$[J] = \begin{bmatrix} \frac{\partial x}{\partial r} & \frac{\partial y}{\partial r} & \frac{\partial z}{\partial r} \\ \frac{\partial x}{\partial s} & \frac{\partial y}{\partial s} & \frac{\partial z}{\partial s} \\ \frac{\partial x}{\partial t} & \frac{\partial y}{\partial t} & \frac{\partial z}{\partial t} \end{bmatrix}
\tag{A.9}$$

dır. Denklem A.3 ve Denklem A.4, Denklem A.9' da yerine konulursa

$$[J] = \begin{bmatrix} \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial r} x_i & \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial r} y_i & \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial r} z_i \\ \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial s} x_i & \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial s} y_i & \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial s} z_i \\ \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial t} x_i & \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial t} y_i & \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial t} z_i \end{bmatrix} \quad (\text{A.10})$$

elde edilir. Burada

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial r} x_i &= \frac{1}{8} [(1-s)(1-t)(x_4 - x_1) + (1-s)(1+t)(x_3 - x_2) \\ &\quad + (1+s)(1-t)(x_8 - x_5) + (1+s)(1+t)(x_7 - x_6)] \\ \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial r} y_i &= \frac{1}{8} [(1-s)(1-t)(y_4 - y_1) + (1-s)(1+t)(y_3 - y_2) \\ &\quad + (1+s)(1-t)(y_8 - y_5) + (1+s)(1+t)(y_7 - y_6)] \\ \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial r} z_i &= \frac{1}{8} [(1-s)(1-t)(z_4 - z_1) + (1-s)(1+t)(z_3 - z_2) \\ &\quad + (1+s)(1-t)(z_8 - z_5) + (1+s)(1+t)(z_7 - z_6)] \\ \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial s} x_i &= \frac{1}{8} [(1-r)(1-t)(x_5 - x_1) + (1-r)(1+t)(x_6 - x_2) \\ &\quad + (1+r)(1+t)(x_7 - x_3) + (1+r)(1-t)(x_8 - x_4)] \\ \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial s} y_i &= \frac{1}{8} [(1-r)(1-t)(y_5 - y_1) + (1-r)(1+t)(y_6 - y_2) \\ &\quad + (1+r)(1+t)(y_7 - y_3) + (1+r)(1-t)(y_8 - y_4)] \\ \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial s} z_i &= \frac{1}{8} [(1-r)(1-t)(z_5 - z_1) + (1-r)(1+t)(z_6 - z_2) \\ &\quad + (1+r)(1+t)(z_7 - z_3) + (1+r)(1-t)(z_8 - z_4)] \\ \sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial t} x_i &= \frac{1}{8} [(1-r)(1-s)(x_2 - x_1) + (1+r)(1-s)(x_3 - x_4) \\ &\quad + (1-r)(1+s)(x_6 - x_5) + (1+r)(1+s)(x_7 - x_8)] \end{aligned} \quad (\text{A.11})$$

$$\sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial t} y_i = \frac{1}{8} [(1-r)(1-s)(y_2 - y_1) + (1+r)(1-s)(y_3 - y_4) \\ + (1-r)(1+s)(y_6 - y_5) + (1+r)(1+s)(y_7 - y_8)]$$

$$\sum_{i=1}^8 \frac{\partial N_i}{\partial t} z_i = \frac{1}{8} [(1-r)(1-s)(z_2 - z_1) + (1+r)(1-s)(z_3 - z_4) \\ + (1-r)(1+s)(z_6 - z_5) + (1+r)(1+s)(z_7 - z_8)]$$

4. Elastik Malzeme Özelliği Matrisi [D]

3 boyutlu katının bir noktasında 6 gerilme bileşeni vardır. Bu bileşenler aşağıdaki şekilde vektör formunda yazılabilmektedir.

$$\sigma^T = \{\sigma_x \quad \sigma_y \quad \sigma_z \quad \tau_{xy} \quad \tau_{xz} \quad \tau_{yz}\} \quad (\text{A.12})$$

Bu 6 gerilmeye karşılık gelen 6 tane de birim şekil değiştirme bileşeni vardır ve bu bileşenlerde aşağıdaki gibi vektör formunda yazılabilir.

$$\varepsilon^T = \{\varepsilon_x \quad \varepsilon_y \quad \varepsilon_z \quad \gamma_{xy} \quad \gamma_{xz} \quad \gamma_{yz}\} \quad (\text{A.13})$$

Gerilme – Birim Şekil Değiştirme ilişkisi matris formda aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$\begin{Bmatrix} \sigma_x \\ \sigma_y \\ \sigma_z \\ \tau_{xy} \\ \tau_{xz} \\ \tau_{yz} \end{Bmatrix} = \frac{E}{(1+\nu)(1-2\nu)} \begin{bmatrix} 1-\nu & \nu & \nu & 0 & 0 & 0 \\ \nu & 1-\nu & \nu & 0 & 0 & 0 \\ \nu & \nu & 1-\nu & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1-2\nu}{2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1-2\nu}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1-2\nu}{2} \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \varepsilon_x \\ \varepsilon_y \\ \varepsilon_z \\ \gamma_{xy} \\ \gamma_{xz} \\ \gamma_{yz} \end{Bmatrix} \quad (\text{A.14})$$

$$\{\sigma\} = [D] \{\varepsilon\} \quad (\text{A.15})$$

Burada [D] 6x6 matris boyutuna sahip olup elastik malzeme özelliklerini temsil eder.

5. Birim Şekil Değiştirme – Düğüm Noktası Yer Değiştirme Matrisi [B]

8 düğüm noktalı eleman için, birim şekil değiştirme – yer değiştirme ilişkisi aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

$$\begin{Bmatrix} \varepsilon_x \\ \varepsilon_y \\ \varepsilon_z \\ \gamma_{xy} \\ \gamma_{xz} \\ \gamma_{yz} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} \frac{\partial u}{\partial x} \\ \frac{\partial v}{\partial y} \\ \frac{\partial w}{\partial z} \\ \frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \\ \frac{\partial u}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial x} \\ \frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial y} \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial x} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\partial}{\partial y} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial}{\partial z} \\ \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} & 0 \\ \frac{\partial}{\partial z} & 0 & \frac{\partial}{\partial x} \\ 0 & \frac{\partial}{\partial z} & \frac{\partial}{\partial y} \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} u \\ v \\ w \end{Bmatrix} \quad (\text{A.16})$$

Denklem A.1'den

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial x} &= \frac{\partial}{\partial r} \frac{\partial r}{\partial x} = \frac{1}{a} \frac{\partial}{\partial r} \\ \frac{\partial}{\partial y} &= \frac{\partial}{\partial s} \frac{\partial s}{\partial y} = \frac{1}{a} \frac{\partial}{\partial s} \\ \frac{\partial}{\partial z} &= \frac{\partial}{\partial t} \frac{\partial t}{\partial z} = \frac{1}{a} \frac{\partial}{\partial t} \end{aligned} \quad (\text{A.17})$$

olduğunu biliyoruz. Denklem A.6 ve Denklem A.17, Denklem 2.16'da yerine konulursa

$$\begin{Bmatrix} \varepsilon_x \\ \varepsilon_y \\ \varepsilon_z \\ \gamma_{xy} \\ \gamma_{xz} \\ \gamma_{yz} \end{Bmatrix} = \frac{1}{a} \begin{bmatrix} \frac{\partial N_1}{\partial r} & 0 & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial r} & 0 & 0 & \dots & \frac{\partial N_8}{\partial r} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\partial N_1}{\partial s} & 0 & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial s} & 0 & \dots & 0 & \frac{\partial N_8}{\partial s} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial N_1}{\partial t} & 0 & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial t} & \dots & 0 & 0 & \frac{\partial N_3}{\partial t} \\ \frac{\partial N_1}{\partial s} & \frac{\partial N_1}{\partial r} & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial s} & \frac{\partial N_2}{\partial r} & 0 & \dots & \frac{\partial N_8}{\partial s} & \frac{\partial N_8}{\partial r} & 0 \\ \frac{\partial N_1}{\partial t} & 0 & \frac{\partial N_1}{\partial r} & \frac{\partial N_2}{\partial t} & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial r} & \dots & \frac{\partial N_8}{\partial t} & 0 & \frac{\partial N_8}{\partial r} \\ 0 & \frac{\partial N_1}{\partial t} & \frac{\partial N_1}{\partial s} & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial t} & \frac{\partial N_2}{\partial s} & \dots & 0 & \frac{\partial N_8}{\partial t} & \frac{\partial N_8}{\partial s} \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} u_1 \\ v_1 \\ w_1 \\ u_2 \\ v_2 \\ w_2 \\ \vdots \\ u_8 \\ v_8 \\ w_8 \end{Bmatrix} \quad (\text{A.18})$$

Denklem A.18 daha basit olarak şu şekilde ifade edilebilir.

$$\{\varepsilon\} = [B]\{u^e\} \quad (\text{A.19})$$

Burada

$$[B] = \frac{1}{a} \begin{bmatrix} \frac{\partial N_1}{\partial r} & 0 & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial r} & 0 & 0 & \dots & \frac{\partial N_8}{\partial r} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\partial N_1}{\partial s} & 0 & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial s} & 0 & \dots & 0 & \frac{\partial N_8}{\partial s} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial N_1}{\partial t} & 0 & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial t} & \dots & 0 & 0 & \frac{\partial N_3}{\partial t} \\ \frac{\partial N_1}{\partial s} & \frac{\partial N_1}{\partial r} & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial s} & \frac{\partial N_2}{\partial r} & 0 & \dots & \frac{\partial N_8}{\partial s} & \frac{\partial N_8}{\partial r} & 0 \\ \frac{\partial N_1}{\partial t} & 0 & \frac{\partial N_1}{\partial r} & \frac{\partial N_2}{\partial t} & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial r} & \dots & \frac{\partial N_8}{\partial t} & 0 & \frac{\partial N_8}{\partial r} \\ 0 & \frac{\partial N_1}{\partial t} & \frac{\partial N_1}{\partial s} & 0 & \frac{\partial N_2}{\partial t} & \frac{\partial N_2}{\partial s} & \dots & 0 & \frac{\partial N_8}{\partial t} & \frac{\partial N_8}{\partial s} \end{bmatrix} \quad (A.20)$$

birim şekil değiştirme – dğüm noktası yer değiştirme matrisini temsil eder. Denklem A.3 Denklem A.20’de yerine konularak, 6x24 boyutuna sahip [B] matrisini r, s ve t ’nin fonksiyonu olarak elde edebiliriz.

6. Eleman Rijitlik Matrisi [K^e]

3 boyutlu eleman için rijitlik matrisi

$$[K^e] = \int \int \int [B]^T [D] [B] dV \quad (A.21)$$

dir. Burada [K^e] eleman rijitlik matrisidir. Elemanlar küp olduğu için Denklem A.1’den

$$dV = dx dy dz = a^3 dr ds dt \quad (A.22)$$

elde ederiz.

$$|J| = a^3 \quad (A.23)$$

|J| jakobiyen matrisinin determinantıdır. dV

$$dV = |J| dr ds dt \quad (A.24)$$

olarak yazılabilir.

Denklem A.23 ve Denklem A.24, Denklem A.21’de yerine yazılırsa

$$[K^e] = a^3 \int_{-1}^1 \int_{-1}^1 \int_{-1}^1 [B]^T [D] [B] dr ds dt \quad (A.25)$$

elde edilir. Denklem A.20’den $[B]^T [D] [B]$ nin r, s ve t ’nin fonksiyonu olduğunu biliyoruz. Bu yüzden, gauss integrasyon yöntemi kullanılarak Denklem A.25’teki ifade yaklaşık olarak aşağıdaki gibi çözülebilir.

$$[K^e] = a^3 \sum_{k=1}^m \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^l W_i^r W_j^s W_k^t [B(r_i, s_j, t_k)]^T [D] [B(r_i, s_j, t_k)] \quad (A.26)$$

Burada w_i^r, w_j^s ve w_k^t gauss ağırlık fonksiyonlarıdır. r_i, s_j ve t_k ise gauss noktaları veya integrasyon noktalarıdır. m, n ve l, r, s ve t doğrultusundaki gauss noktalarının sayısıdır. Genellikle 8 düğüm noktalı küp eleman için r, s ve t doğrultularında 2 gauss noktası alınması rijitlik matrisini doğru hesaplamak için yeterlidir. Bundan dolayı 3 boyutlu sonlu elemanlar analizinde n, m ve l 2 olarak alınmıştır. Sonuç olarak 8 düğüm noktasına sahip olan elemanda toplam 8 adet gauss noktası vardır. Gauss ağırlık fonksiyonları ve noktaları Çizelge A.1’de verilmiştir.



Çizelge A.1 : Gauss noktalı 8 düğümlü eleman için gauss ağırlık fonksiyonları ve noktaları.

Nokta	r_i	s_j	t_k	W_i^r	W_j^s	W_k^t
1	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	1	1	1
2	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	1	1	1
3	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	1	1	1
4	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	1	1	1
5	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	1	1	1
6	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	1	1	1
7	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	1	1	1
8	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$\sqrt{\frac{1}{3}}$	$-\sqrt{\frac{1}{3}}$	1	1	1

Global rijitlik matrisini elde etmek için her bir eleman için hesaplanan rijitlik matrisleri kullanarak montaj işlemi yapılır.

7. Birim Şekil Değiştirme Enerjisi Yoğunluğu (u_e)

Birim hacimdeki birim şekil değiştirme enerjisi

$$u_e = \frac{1}{2} \{\varepsilon\}^T \{\sigma\} = \frac{1}{2} \{\varepsilon\}^T [D] \{\varepsilon\} \quad (\text{A.27})$$

dir.

$$u_e = \frac{1}{2} (\sigma_x \varepsilon_x + \sigma_y \varepsilon_y + \sigma_z \varepsilon_z + \tau_{xy} \gamma_{xy} + \tau_{xz} \gamma_{xz} + \tau_{yz} \gamma_{yz}) \quad (\text{A.28})$$

EK B

1. 3 Boyutlu Sonlu Elemanlar Kodlarının MATLAB Ortamında Oluşturulması

EK A'da verilen sonlu elemanlar analizi teorisi kullanılarak MATLAB üzerinde kodlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonlu elemanlar analizinde düğüm noktaları koordinatı verileri ve elemanların hangi düğüm noktalarından oluştuğunu gösteren eleman bağlantısallık verileri dışarıdan mesh verileri olarak Şekil B.1'de gösterildiği gibi csvread komutuyla alınmıştır.

```
coord=csvread('coordinates.txt'); %Coordinate table  
conn=csvread('conn_2.txt'); %Connectivity table
```

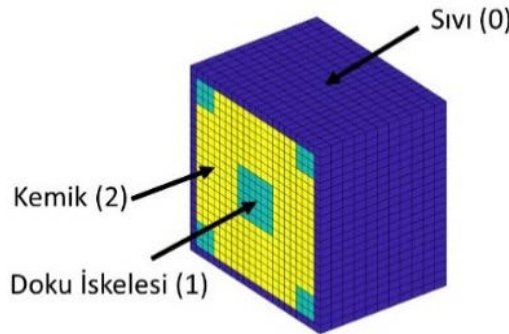
Şekil B.1: Mesh verilerinin alınması.

Sonlu elemanlar modelinde Şekil 2.6'da gösterildiği gibi doku iskelesi, kemik ve sıvı gibi 3 farklı tipte malzeme kullanılacaktır. Her malzeme farklı özelliklere sahip olduğu için bu malzemeleri ayırt etmek ve doğru malzeme bilgisini atayabilmek için bağlantısallık tablosuna bir sütun daha ilave edilmiştir. Bu sütun malzeme tiplerini ayırt edebilmek için kullanılmıştır. Şekil B.2'de sonlu elemanlar analizinde kullanılan eleman bağlantısallık tablosu ve malzeme tipleri verilmiştir. Eleman bağlantısallık tablosunun 10. sütununda 0 yazan satırlar o elemanın sıvı olduğunu, 1 yazan satırlar o elemanın doku iskelesi olduğunu ve 2 yazan satırlar o elemanın kemik dokusu olduğunu göstermektedir. Malzeme tiplerini ayırt etmek için Şekil 2.6'daki doku iskelesi, kemik ve sıvı geometrileri içi dolu bir küpün içine monte edilmiş ve ayrı ayrı mesh işlemi yapılmıştır. Daha sonra dolu küpün eleman koordinatlarıyla analizi yapılacak geometrilerin eleman koordinatları birbiriyle kıyaslanmıştır. Eğer koordinatlar çakışıyorsa dolu küpün bağlantısallık matrisinin 10. sütununa çakışan geometrinin malzeme tipi değeri yazılmıştır. Böylelikle tek bir mesh verisi üzerinden 3 farklı tipte malzeme tanımlaması yapılmıştır.

Eleman Numarası	Elemandaki Düğüm Noktalarının Numarası									Malzeme Tipi
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
567	567	1144	1145	1168	1167	615	616	639	638	1
568	568	1145	1146	1169	1168	616	617	640	639	1
569	569	1146	1147	1170	1169	617	618	641	640	1
570	570	1147	1148	1171	1170	618	619	642	641	1
571	571	1148	1149	1172	1171	619	620	643	642	1
572	572	1149	1150	1173	1172	620	621	644	643	0
573	573	1151	1152	1175	1174	622	623	646	645	0
574	574	1152	1153	1176	1175	623	624	647	646	1
575	575	1153	1154	1177	1176	624	625	648	647	1
576	576	1154	1155	1178	1177	625	626	649	648	1
577	577	1155	1156	1179	1178	626	627	650	649	2
578	578	1156	1157	1180	1179	627	628	651	650	2
579	579	1157	1158	1181	1180	628	629	652	651	2
580	580	1158	1159	1182	1181	629	630	653	652	2
581	581	1159	1160	1183	1182	630	631	654	653	2
582	582	1160	1161	1184	1183	631	632	655	654	2
583	583	1161	1162	1185	1184	632	633	656	655	2
584	584	1162	1163	1186	1185	633	634	657	656	2
585	585	1163	1164	1187	1186	634	635	658	657	2
586	586	1164	1165	1188	1187	635	636	659	658	2
587	587	1165	1166	1189	1188	636	637	660	659	2
588	588	1166	1167	1190	1189	637	638	661	660	2
589	589	1167	1168	1191	1190	638	639	662	661	2
590	590	1168	1169	1192	1191	639	640	663	662	2
591	591	1169	1170	1193	1192	640	641	664	663	1
592	592	1170	1171	1194	1193	641	642	665	664	1

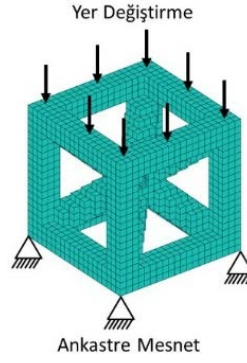
Şekil B.2: Eleman bağlantısallık tablosu ve malzeme tipleri.

Şekil B.3’de sonlu elemanlar modelinde kullanılan mesh ve malzeme tipleri kesit alınmış şekilde gösterilmiştir. Bu malzeme tiplerine göre malzeme özellikleri (elastisite modülü ve poisson oranı) her bir eleman için tanımlanmıştır. Doku iskelesi ve kemik için Poisson Oranı 0,3 olarak seçilmiş ve tüm analiz boyunca Poisson oranının değişmediği kabul edilmiştir. Sıvı ise sıkıştırılmaz malzeme olarak kabul edilmiştir. Bundan dolayı Poisson Oranı 0,49 olarak alınmış ve analiz sürecinde sabit olduğu kabul edilmiştir (Shui ve ark., 2019). Sıvının elastisite modülünün analiz süresince değişmediği ve değerinin 1 MPa olduğu kabul edilmiştir (Chen ve ark., 2021).



Şekil B.3 : Mesh ve malzeme tipleri.

Sonlu elemanlar analizinde kullanılan sınır şartları Şekil B.4’te gösterilmiştir. Doku iskelesi alt kısmından ankastre olarak mesnetlenmiştir. Yükleme ise üst kısımdaki düğüm noktalarından yer değiştirme olarak tanımlanmıştır.



Şekil B.4: Sonlu elemanlar analizinde kullanılan sınır şartları.

Sınır şartlarını MATLAB üzerinden tanımlamak için düğüm noktalarının koordinat tablosundan en alt ve üstteki düğüm noktalarının koordinat değerleri Şekil B.5'teki gibi tespit edilmiştir.

```
%Finding bottom nodes on element for scaffold
for i=1:NN
    fx(i)=coord(i,2);
end
for i=1:NN
    fy(i)=coord(i,3);
end
for i=1:NN
    fz(i)=coord(i,4);
end
minx=min(fx); % minimum value of x
maxx=max(fx); % maximum value of x
miny=min(fy); % minimum value of y
maxy=max(fy); % maximum value of y
minz=min(fz); % minimum value of z down side of plate
maxz=max(fz); % maximum value of z up side of plate
```

Şekil B.5: Düğüm noktalarının minimum ve maksimum koordinat değerlerinin belirlenmesi.

Şekil B.5'teki gibi düğüm noktalarının minimum ve maksimum koordinat değerleri kullanılarak Şekil B.6'daki gibi mesnet koşulları tanımlanmıştır.

```
BCS=NaN(3*NN,1); %initial boundry conditions vector (zeros)
%BCS vector
for i=1:NE
    for j=2:9
        if coord(conn(i,j),4)==minz
            BCS(3*(conn(i,j))-2,1)=0; %down side of element (x)
            BCS(3*(conn(i,j))-1,1)=0; %down side of element (y)
            BCS(3*(conn(i,j)),1)=0; %down side of element (z)
        end
    end
end
```

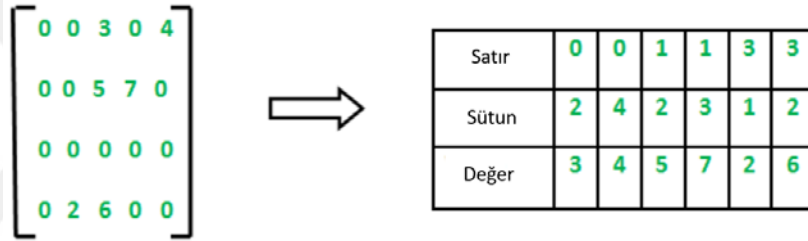
Şekil B.6: Mesnet şartlarının tanımlanması.

Bunun için öncelikle BCS isimli boş bir matris tanımlanmıştır. Her bir düğüm noktası x , y ve z doğrultularında 3 serbestlik derecesine sahip olduğu için, bu matrisin her 3 satırı 1 düğüm noktasının sırasıyla x , y ve z doğrultularındaki sınır şartını tanımlamaktadır. Şekil B.4'te verilen mesnet şartlarını uygulamak için her bir elemandaki düğüm noktalarının z eksenindeki koordinat değerlerinin minimum değerle eşleşip eşleşmediği kontrol edilmiştir. Eğer minimum değerle eşleşme varsa o düğüm noktasının sırasına denk gelen 3 satıra da 0 değeri yazılmıştır. Böylelikle o

düğüm noktasının x , y ve z doğrultularındaki hareketi kısıtlanmıştır. Yükleme şartı ise yer değiştirme olarak tanımlanacağı için global rijitlik matrisi oluşturulduktan sonra oluşturulacaktır.

2. Sonlu Elemanlar Yönteminde Global Rijitlik Matrisinin Sparse Arrays Yöntemiyle Oluşturulması

Sonlu elemanlar yönteminde global rijitlik matrislerinin boyutu yüksek eleman ve düğüm sayılarına çıktıkça artmaktadır. Bundan dolayı bilgisayarların bellekleri (RAM) yüksek elemanlar için yetersiz kalmaktadır. Global rijitlik matrisleri çok fazla sayıda sıfır içerdiği için sadece değeri olan matris elemanları matris koordinatına göre kaydedildiği zaman bellek kullanımı ciddi oranda düşmektedir. Bu yönetime sparse arrays adı verilmektedir. Şekil B.7’de klasik formdaki matrisin sparse formda gösterimi verilmiştir.



Şekil B.7: Sparse arrays matrisi.

Bol miktarda sıfır içeren 4x5 boyutundaki matris sparse arrays formatında 3x6 boyutuna inmiştir. Klasik formatta bellekte 20 adet sayı tutulacakken sparse arrays sayesinde 18 adet sayı tutulacaktır. Küçük boyutlu matrislerde aradaki fark az da olsa matris boyutu ve içerdiği sıfır sayısı arttıkça aradaki fark da giderek artacaktır. Yüksek eleman ve düğüm sayılarına çıkma ihtiyacı duyulduğu için global rijitlik matrisi için sparse arrays algoritması geliştirilmiştir. Geliştirilen algorithmada global rijitlik matrisi hiç oluşturulmadan doğrudan eleman rijitlik matrisinden sparse arrays formatındaki global rijitlik matrisine montaj işlemi yapılmıştır. Bunun için öncelikle global rijitlik matrisinin boyutları belirlenmiştir. Global rijitlik matrisinin boyutlarını belirlemek için öncelikle eleman bağlantısallık tablosundan her düğüm noktasının kaç elemanda kullanıldığı tespit edilmiştir. Böylelikle global rijitlik matrisinin o düğüm noktasıyla ilgili satırında kaç adet sütunun kullanıldığı tespit edilmiştir. Her satır için kaç sütunun kullanıldığı tespit edilerek sparse arrays formatında global matrisin boyutları tespit edilmiştir. Sparse arrays formatında global rijitlik matrisinin ilk satırı satır değerlerini

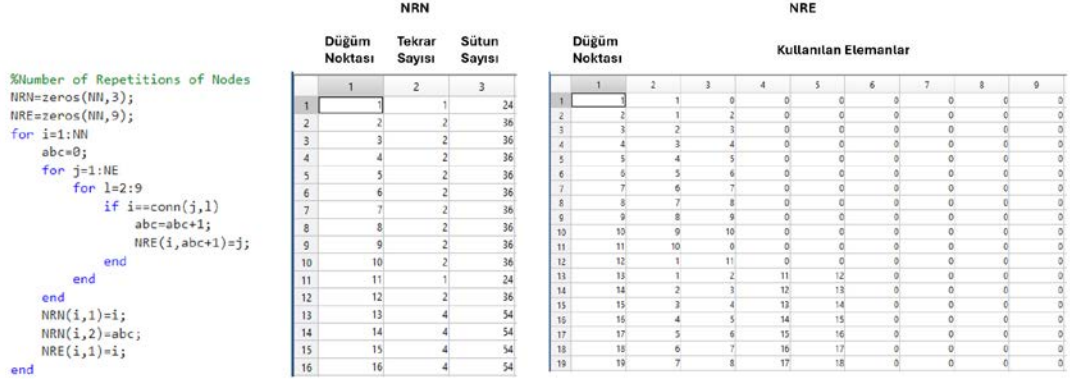
temsil etmektedir. Bu değerler her bir düğüm noktasının kaç elemanda kullanıldığına göre yerleştirilmiştir. İkinci satır ise kolon değerlerini temsil etmektedir. İkinci satırı doğru bir şekilde adresleyebilmek için ilk olarak her bir düğüm noktasının hangi elemanlarda kullanıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca eleman bağlantısallık tablosundan her bir elemanın rijitlik matrisindeki satır ve sütun değerleri hesaplanıp ayrı bir tabloya kaydedilmiştir. Daha sonra ilgili elemanların satır ve sütun değerleri arka arkaya başka bir tabloda kaydedilmiştir. Burada kaydedilen değerler küçükten büyüğe sıralanarak global rijitlik matrisinin ikinci satırında ilgili düğüm noktalarının olduğu yerlere yazdırılmıştır. Daha sonra her bir eleman için eleman rijitlik matrisleri hesaplanmış ve eleman rijitlik matrisleri de sparse arrays formuna dönüştürülmüştür. Eleman rijitlik matrisindeki değerlerin doğru yerlere gönderilmesi için eleman bağlantısallık tablosu kullanılmıştır. Buradaki düğüm noktası sırasıyla global rijitlik matrisindeki yerleri saptanmıştır. Ayrıca bu düğüm noktaları birden fazla elemanda ortak kullanıldığı için kendi elemanından daha fazla yer kaplayacağı için kolon değerlerinin de doğru bir şekilde saptanması gerekmektedir. Bunun için global rijitlik matrisinin ikinci satırıyla eleman rijitlik matrisinin ikinci satırları karşılaştırılmıştır. Eğer eşleşme gerçekleşirse eleman rijitlik matrisindeki değer global rijitlik matrisindeki ilgili yere toplanarak yazılmıştır. Böylelikle hiç global rijitlik matrisi oluşturulmadan sparse arrays formundaki global rijitlik matrisine montaj işlemi gerçekleştirilmiştir. Buraya kadar anlatılan kısımların uygulaması 3 boyutlu sonlu elemanlar uygulaması için gerçekleştirilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	122	123	134	133	1	2	13	12
2	2	123	124	135	134	2	3	14	13
3	3	124	125	136	135	3	4	15	14
4	4	125	126	137	136	4	5	16	15
5	5	126	127	138	137	5	6	17	16
6	6	127	128	139	138	6	7	18	17
7	7	128	129	140	139	7	8	19	18

	1	2	3	4
1	1	5	5	10
2	2	5	4	10
3	3	5	3	10
4	4	5	2	10
5	5	5	1	10
6	6	5	0	10
7	7	5	-1	10
8	8	5	-2	10
9	9	5	-3	10
10	10	5	-4	10
11	11	5	-5	10
12	12	5	5	9

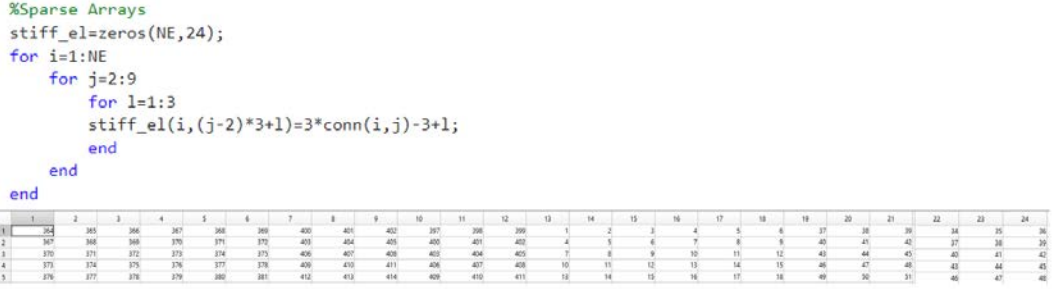
Şekil B.8: 3 boyutlu elemanın bağlantısallık ve düğüm noktası koordinat tablosu.

Şekil B.8’de 1000 elemandan oluşan 3 boyutlu küpün eleman bağlantısallık ve düğüm noktası koordinat tablosunun bir kısmı verilmiştir. 3 boyutlu sonlu elemanlar analizinde 8 adet düğüm noktasına sahip hexahedron elemanlar kullanılmıştır. Global rijitlik matrisini oluşturmak için eleman bağlantısallık tablosu kullanılarak her bir düğüm noktasının kaç kere kullanıldığı Şekil B.9’da verilen kodla tespit edilmiştir.



Şekil B.9: Düğüm noktalarının tekrar sayısı ve kullanıldığı elemanlar.

Eleman bağlantısallık tablosu kullanılarak her bir elemanın rijitlik matrisindeki satır ve sütun değerleri Şekil B.10'daki kod ile belirlenmiştir.



Şekil B.10: Eleman rijitlik matrisinin satır ve sütun değerleri.

NRE matrisindeki sıfır olmayan değerlere göre Şekil B.10'da verilen satır ve sütun değerleri arka arkaya Şekil B.11'deki kodla NEL_sort matrisinin içerisine yazılmıştır. Daha sonra küçükten büyüğe doğru sıralandıktan sonra tekrar eden değerler tespit edilerek yerlerine sıfır yazılmıştır.

```

NEL=zeros(NN,192);
NEL_sort=zeros(NN,192);
for i=1:NN
    for j=2:9
        if NRE(i,j)~=0
            NEL(i,1+(j-2)*24:(j-1)*24)=stiff_el(NRE(i,j),1:24);
        end
    end
    NEL_sort(i,:)=sort(NEL(i,:));
    for jj=2:192
        if NEL_sort(i,jj-1)==NEL_sort(i,jj)
            NEL_sort(i,jj-1)=0;
        end
    end
    aa=0;
    for jjj=1:192
        if NEL_sort(i,jjj)~=0
            aa=aa+1;
            NRN(i,3)=aa;
        end
    end
end
end

```

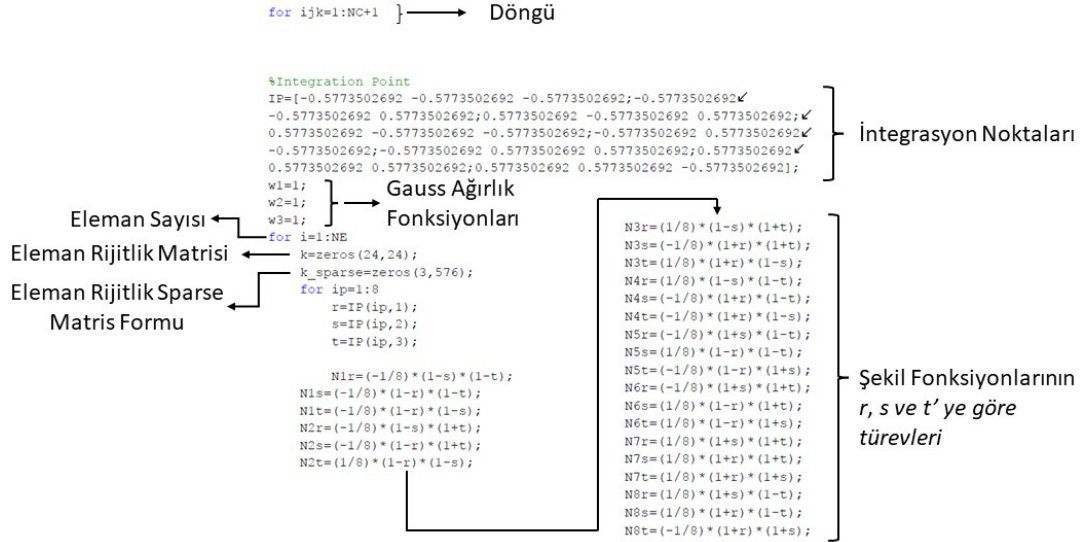
Şekil B.11: NEL matrisinin oluşturulması.

Daha sonra global rijitlik matrisinin sparse arrays formunda oluşturulmuştur. Oluşturulan bu matrisin birinci ve ikinci satır değerleri Şekil B.12’de verilen kodlarla yazılmıştır.

```
%Global Sparse Arrays
global_stiffnes=zeros(3,sum(NRN(:,3))*3);
for i=1:NN
    for l=1:3
        global_stiffnes(1,1+sum(NRN(1:i-1,3))*3+NRN(i,3)*(1-1):sum(NRN(1:(i-1),3))*3+NRN(i,3)*1)=i*3-3+1;
    end
    for bbb=1:3
        abcde=0;
        for j=1:192
            if NEL_sort(i,j)~=0
                abcde=abcde+1;
                global_stiffnes(2,sum(NRN(1:i-1,3))*3+abcde+NRN(i,3)*(bbb-1))=NEL_sort(i,j);
            end
        end
    end
end
end
```

Şekil B.12: Global rijitlik matrisinin sparse arrays formunda oluşturulması.

Global rijitlik matrisinin 3. Satırını olan değerler kısmı her bir elemanın rijitlik matrisi hesaplandıktan sonra ilgili yerlere montaj işlemi gerçekleştirilecektir. Eleman rijitlik matrislerinin hesaplanmasına geçilmeden önce Q matrisi tanımlanmıştır. Bu Q matrisinde düğüm noktalarının x , y ve z doğrultularındaki yer değiştirmeleri tutulacaktır. In silico model dögüsel bir şekilde çalışacağı için Q matrisinin satır sayısı düğüm sayısının 3 katıyken, sütun sayısı ise dögü sayısı kadar tanımlanmıştır. Böylelikle in silico model çözümü tamamlandıktan sonra istenilen dögüdeki düğüm noktalarının yer değiştirme verilerine erişilebilecek ve istenildiği gibi çıktıları kullanılabilir. Benzer şekilde elastisite modülü için E matrisi ve kemik yoğunluğu için ise $rooo$ matrisleri tanımlanmıştır. Bu matrislerin satır sayısı eleman sayısı kadarken, sütun sayısı ise dögü sayısı kadardır. Analize başlamadan önce sadece başlangıç elastisite modülleri ve kemik yoğunluk verileri ilk sütuna girilmiştir. Diğer sütunlar dögü ilerledikçe hesaplanarak doldurulacaktır.



Şekil B.13: Sonlu elemanlar kodu.

Şekil B.13'te verilen kodlarla birlikte döngüsel sonlu elemanlar analizi başlamıştır. İlk olarak eleman rijitlik matrisleri hesaplanacaktır. Kullanılacak gauss ağırlık fonksiyonları ve integrasyon noktaları tanımlandıktan sonra her bir eleman için eleman rijitlik matrisi hesaplanacaktır. Ayrıca bu eleman rijitlik matrisleri sparse matris formuna getirilecektir. Sparse matris formundaki eleman rijitlik matrisinden de yine sparse formda olan global rijitlik matrisine montaj işlemi yapılacaktır.

```

G=[N1r 0 0 N2r 0 0 N3r 0 0 N4r 0 0 N5r 0 0 N6r 0 0 N7r 0 0 N8r 0 ✓
0;
N1s 0 0 N2s 0 0 N3s 0 0 N4s 0 0 N5s 0 0 N6s 0 0 N7s 0 0 N8s 0 ✓
0;
N1t 0 0 N2t 0 0 N3t 0 0 N4t 0 0 N5t 0 0 N6t 0 0 N7t 0 0 N8t 0 ✓
0;
0 N1r 0 0 N2r 0 0 N3r 0 0 N4r 0 0 N5r 0 0 N6r 0 0 N7r 0 0 N8r ✓
0;
0 N1s 0 0 N2s 0 0 N3s 0 0 N4s 0 0 N5s 0 0 N6s 0 0 N7s 0 0 N8s ✓
0;
0 N1t 0 0 N2t 0 0 N3t 0 0 N4t 0 0 N5t 0 0 N6t 0 0 N7t 0 0 N8t ✓
0;
0 0 N1r 0 0 N2r 0 0 N3r 0 0 N4r 0 0 N5r 0 0 N6r 0 0 N7r 0 0 ✓
N8r;
0 0 N1s 0 0 N2s 0 0 N3s 0 0 N4s 0 0 N5s 0 0 N6s 0 0 N7s 0 0 ✓
N8s;
0 0 N1t 0 0 N2t 0 0 N3t 0 0 N4t 0 0 N5t 0 0 N6t 0 0 N7t 0 0 ✓
N8t];

```

Şekil B.14: G matrisi.

Şekil B.14'te şekil fonksiyonlarının türevini içeren G matrisi verilmiştir. G matrisi EK A'daki Denklem A.20'de verilen B matrisini hesaplamak için kullanılacaktır.

```

if conn(i,10)==0 → Sıvı
    n=nf; → Sıvının Poisson Oranı
else
    n=nss; → Doku İskelesi ve Kemik için Poisson Oranı
end

%D
D=(E(i,ijk)/((1+n)*(1-2*n)))*[1-n n n 0 0 0;n 1-n n 0 0 0;n n 1-n
0 0 0;0 0 0 0.5-n 0 0;0 0 0 0 0.5-n 0; 0 0 0 0 0 0.5-n];

```

Malzeme Matrisi

Şekil B.15: Poisson oranı tanımlaması ve malzeme matrisi.

Şekil B.15'te Poisson Oranının ve malzeme matrisinin oluşturulması verilmiştir. Poisson Oranı ataması eleman bağlantısallık tablosunun 10. sütunundaki değere göre tanımlanmıştır. Malzeme matrisindeki elastisite modülü değeri ise E matrisinden alınmıştır.

```

x1=coord(conn(i,2),2);
x2=coord(conn(i,3),2);
x3=coord(conn(i,4),2);
x4=coord(conn(i,5),2);
x5=coord(conn(i,6),2);
x6=coord(conn(i,7),2);
x7=coord(conn(i,8),2);
x8=coord(conn(i,9),2);
y1=coord(conn(i,2),3);
y2=coord(conn(i,3),3);
y3=coord(conn(i,4),3);
y4=coord(conn(i,5),3);
y5=coord(conn(i,6),3);
y6=coord(conn(i,7),3);
y7=coord(conn(i,8),3);
y8=coord(conn(i,9),3);
z1=coord(conn(i,2),4);
z2=coord(conn(i,3),4);
z3=coord(conn(i,4),4);
z4=coord(conn(i,5),4);
z5=coord(conn(i,6),4);
z6=coord(conn(i,7),4);
z7=coord(conn(i,8),4);
z8=coord(conn(i,9),4);

```

Düğüm Noktalarının Koordinatları

Şekil B.16: Eleman düğüm noktalarının koordinatları.

Şekil B.16'da Jakobien matrisinin değerini hesaplamak için kullanılacak olan eleman düğüm noktalarının koordinatları verilmiştir.

```

%J
J11=(1/8)*(1-s)*(1-t)*(x4-x1)+(1-s)*(1+t)*(x3-x2)+(1+s)*(1-t)*
(x8-x5)+(1+s)*(1+t)*(x7-x6);
J12=(1/8)*(1-s)*(1-t)*(y4-y1)+(1-s)*(1+t)*(y3-y2)+(1+s)*(1-t)*
(y8-y5)+(1+s)*(1+t)*(y7-y6);
J13=(1/8)*(1-s)*(1-t)*(z4-z1)+(1-s)*(1+t)*(z3-z2)+(1+s)*(1-t)*
(z8-z5)+(1+s)*(1+t)*(z7-z6);
J21=(1/8)*(1-r)*(1-t)*(x5-x1)+(1-r)*(1+t)*(x6-x2)+(1+r)*(1+t)*
(x7-x3)+(1+r)*(1-t)*(x8-x4);
J22=(1/8)*(1-r)*(1-t)*(y5-y1)+(1-r)*(1+t)*(y6-y2)+(1+r)*(1+t)*
(y7-y3)+(1+r)*(1-t)*(y8-y4);
J23=(1/8)*(1-r)*(1-t)*(z5-z1)+(1-r)*(1+t)*(z6-z2)+(1+r)*(1+t)*
(z7-z3)+(1+r)*(1-t)*(z8-z4);
J31=(1/8)*(1-r)*(1-s)*(x2-x1)+(1+r)*(1-s)*(x3-x4)+(1-r)*(1+s)*
(x6-x5)+(1+r)*(1+s)*(x7-x8);
J32=(1/8)*(1-r)*(1-s)*(y2-y1)+(1+r)*(1-s)*(y3-y4)+(1-r)*(1+s)*
(y6-y5)+(1+r)*(1+s)*(y7-y8);
J33=(1/8)*(1-r)*(1-s)*(z2-z1)+(1+r)*(1-s)*(z3-z4)+(1-r)*(1+s)*
(z6-z5)+(1+r)*(1+s)*(z7-z8);

J=[J11 J12 J13;J21 J22 J23;J31 J32 J33]; → Jakobien Matrisi
%J reverse
J_r=inv(J); → Jakobien Matrisinin Tersi

```

Jakobien Matrisinin Elemanları

Şekil B.17: Jakobien matrisinin oluşturulması.

Şekil B.17’de jakobien matrisinin elemanlarının hesaplanması ve jakobien matrisinin oluşturulması verilmiştir. Şekil B.18’de A matrisi jakobien matrisinin tersinin elemanlarından oluşmaktadır.

```

% $\bar{A}$ 
A=[J_r(1,1) J_r(1,2) J_r(1,3) 0 0 0 0 0 0;
  0 0 0 J_r(2,1) J_r(2,2) J_r(2,3) 0 0 0;
  0 0 0 0 0 J_r(3,1) J_r(3,2) J_r(3,3);
  0 0 0 J_r(3,1) J_r(3,2) J_r(3,3) J_r(2,1) J_r(2,2) J_r(2,3);
  J_r(3,1) J_r(3,2) J_r(3,3) 0 0 0 J_r(1,1) J_r(1,2) J_r(1,3);
  J_r(2,1) J_r(2,2) J_r(2,3) J_r(1,1) J_r(1,2) J_r(1,3) 0 0 0];

```

Şekil B.18: A matrisi.

Şekil B.14’te verilen G matrisi ile Şekil B.18’de verilen A matrisi çarpılarak EKA ’da verilen Denklem A.20’deki B matrisi elde edilmiştir. B matrisi elde edildikten sonra Şekil B.19’da gösterildiği gibi eleman rijitlik matrisi hesaplanmıştır.

```

%Stiffness Matrix for One Element
k=k+B'*D*B*det(J);
end

```

Şekil B.19: Eleman rijitlik matrisinin hesaplanması.

Burada eleman rijitlik matrisi olan k matrisi her yeni elemana geçildiğinde tüm değerleri Şekil B.13’te gösterildiği gibi sıfırlanmaktadır ve aynı eleman döngüsünün içerisinde 8 integrasyon noktası için B ve J matrisleri hesaplanarak Şekil B.19’daki gibi k matrisinde toplanarak eleman rijitlik matrisi hesaplanmıştır. Eleman rijitlik matrisi hesaplandıktan sonra Şekil B.20’deki gibi eleman rijitlik matrisi sparse matris formuna dönüştürülmüştür.

```

%Sparse Stiffness Matrix for One Element
%First Row of Stiffness Matrix for One Element
for j=2:9
  for l=1:3
    k_sparse(1,1+(j-2)*72+(l-1)*24:24*l+(j-2)*72)=3*conn(i,j)-3*
+1;
  end
end
%Second Row of Stiffness Matrix for One Element
for jj=1:24
  for j=2:9
    for l=1:3
      k_sparse(2,(j-2)*3+1+(jj-1)*24)=3*conn(i,j)-3+1;
    end
  end
end
%Third Row of Stiffness Matrix for One Element
for jj=1:24 %Number of row of stiffness matrix
  for ll=1:24 %Number of column of stiffness matrix
    k_sparse(3,ll+(jj-1)*24)=k(jj,ll);
  end
end
end

```

Şekil B.20: Eleman rijitlik matrisinin sparse arrays formuna dönüştürülmesi.

Eleman rijitlik matrisleri sparse arrays formunda oluşturulduktan sonra global rijitlik matrisine montajlama işlemine geçilmiştir. Bunun için iki aşamalı sütun adresleme işlemi yapılmıştır. İlk aşamada eleman bağlantısallık tablosu kullanılarak hangi sütun aralığında olduğu tespit edilmiştir. İkinci aşamada ise o aralıkta hangi sütuna geleceği tespit edilerek değerler global rijitlik matrisine işlenmiştir. Bu işlemi yapan kod Şekil B.21’de verilmiştir.

```

%Global Stiffness Matrix Sparse Array
for j=2:9
    abcd2=NRN(conn(i,j),3);
    abcde=sum(NRN(1:conn(i,j)-1,3))*3;
    for l12=1:3
        for jj=1:24
            for jjj=1:abcd2
                if k_sparse(2,jj+72*(j-2)+24*(l12-1))
==global_stiffnes(2,abcde+jjj+abcd2*(l12-1))
                    global_stiffnes(3,abcde+jjj+abcd2*(l12-1))
==global_stiffnes(3,abcde+jjj+abcd2*(l12-1))+k_sparse(3,jj+72*(j-2)+24*
(l12-1));
                end
            end
        end
    end
end
end
end
end

```

Şekil B.21: Global rijitlik matrisi montajı.

Oluşturulan algoritma sayesinde klasik formdaki global rijitlik matrisi hiç oluşturulmadan sparse arrays formundaki global rijitlik matrisi elde edilebilmiştir. Bu sayede fiziksel bellek (RAM) kullanımından ciddi şekilde tasarruf edildiği için milyon mertebesinde düğüm noktası ve eleman sayısına ulaşılabilecektir.

Global rijitlik matrisi sparse arrays formunda oluşturulduktan sonra sınır şartlarını uygulamak için penaltı katsayısı Şekil B.22’de gösterildiği gibi belirlenmiştir.

```

%Penalty Method
CCC=max(global_stiffnes(3,1:sum(NRN(:,3))*3))*100;
for ii=3:3:NN*3
    if BCS(ii,1)==0
        i=ii/3;
        for j=1:NRN(i,3)*3
            if global_stiffnes(1,sum(NRN(1:i-1,3))*3+j)
==global_stiffnes(2,sum(NRN(1:i-1,3))*3+j)
                global_stiffnes(3,sum(NRN(1:i-1,3))*3+j)=global_stiffnes(3,sum
(NRN(1:i-1,3))*3+j)+CCC;
            end
        end
    end
end
end
end

```

Şekil B.22: Sınır şartlarının uygulanması.

Düğüm noktalarının hangi doğrultuda hareketinin kısıtlanacağı BCS matrisinde 0 yazılarak belirlenmiştir. Böylelikle sparse arrays formundaki global rijitlik matrisinin hangi köşegen elemanına penaltı katsayısının ilave edileceği belirlenmiştir. Bu şekilde istenen düğüm noktalarının istenen doğruludaki hareketleri kısıtlanmıştır.

Sonlu elemanlar analizinde uygulanacak kuvvet değerini doğrudan düğüm noktalarına uygulamak yerine penaltı yöntemini kullanarak düğüm noktaları üzerinden yer değiştirme olarak uygulanmıştır. Bunun sebebi sonlu elemanlar analizindeki elemanların elastisite modülleri arasında ciddi farklılıkların olmasıdır. Sonlu elemanlar analizinde mesnet şartlarını belirlemek için kullanılan penaltı katsayısı yükleme şartını da tanımlamak için kullanılmıştır.

```

%Force Vector
F=zeros(3*NN,1); → Kuvvet Vektörü
for i=1:NN
    if coord(i,4)==maxz → En Üst Düğüm Noktaları
        F(3*i,1)=F(3*i,1)+CCC*DP; → Yer Değiştirme Miktarı
        for rrr=1:NRN(i,3) → Penaltı Katsayısı
            if global_stiffnes(2,sum(NRN(1:i-1,3))*3+2*NRN(i,3)+rrr) ✓
==global_stiffnes(1,sum(NRN(1:i-1,3))*3+2*NRN(i,3)+rrr)
                global_stiffnes(3,sum(NRN(1:i-1,3))*3+2*NRN(i,3)+rrr) ✓
==global_stiffnes(3,sum(NRN(1:i-1,3))*3+2*NRN(i,3)+rrr)+CCC;
            end
        end
    end
end
end
end
end

```

Şekil B.23: Kuvvet vektörünün oluşturulması.

Burada verilmek istenen yer değiştirme miktarı penaltı katsayısıyla çarpılarak kuvvet matrisine yazılmıştır. Ayrıca global rijitlik matrisinde ilgili düğüm noktasının köşegen elemanına da penaltı katsayısı eklenilmiştir. Şekil B.23'te yer değiştirme şeklinde tanımlanan kuvvet matrisinin algoritması verilmiştir.

$$\{F\} = [K]\{Q\} \quad (B.1)$$

Mesnet ve yükleme şartları da tanımlandıktan sonra Denklem B.1 çözülebilir. Bunun için sparse array formundaki global rijitlik matrisinin tersi alınması gereklidir. Bu matrisin tersini almak için Conjugate Gradient yöntemi seçilmiştir. Conjugate Gradient yöntemi matematikte, özellikle pozitif tanımlı matrislerin sayısal çözümü için kullanılan bir algoritmadır. Bu yöntem genellikle yinelemeli bir algoritma olarak kullanılır. Büyük ve seyrek matrislerle uğraşırken Gauss eliminasyon veya Cholesky ayrıştırması gibi doğrudan yöntemlerden daha etkili olabilir (Andrei, 2020). Özellikle sonlu elemanlar yöntemindeki büyük ve seyrek rijitlik matrislerinin çözümünde kullanılan bu yöntem, bu tür durumlarda oldukça verimli çalışır. Conjugate Gradient yöntemi Denklem B.1'de verilen form için uygundur. Conjugate gradient (CG) gibi iteratif yöntemler sparse matrislerle kullanmak için de uygundur. Ayrıca bu yöntemler de kendi içinde farklı şekillerde uygulanmaktadır. Sparse formundaki rijitlik matrisini çözmek için hızlı yakınsayan Stabilized Biconjugate Gradient Method (Bicgstab) seçilmiştir. Bu yöntemin MATLAB içinde hazır fonksiyonunun olması da uygulanmasını kolaylaştırmıştır. Şekil B.24'de MATLAB içerisinde Stabilized

Biconjugate Gradient fonksiyonu kullanılarak Q düğüm noktası yer değiştirme matrisinin çözümü verilmiştir. Yakınsama toleransı $1e-6$ ve maksimum iterasyon sayısı 1000 olarak seçilmiştir.

```

rows = global_stiffnes(1,1:sum(NRN(1:NN,3))*3);
cols = global_stiffnes(2,1:sum(NRN(1:NN,3))*3);
values = global_stiffnes(3,1:sum(NRN(1:NN,3))*3);
nnn = NN*3; % Number of rows or columns

% Create a sparse matrix from the given sparse data
K_sparse = sparse(rows, cols, values, nnn, nnn); → Sparse Rijitlik Matrisi

Q(:,ijk)=bicgstab(K_sparse,F,1e-6,1000);

```

Kuvvet Matrisi Tolerans Değeri

Şekil B.24: Stabilized biconjugate gradient yöntemi.

Düğüm noktalarının yer değiştirme değerleri Q matrisinde hesaplandıktan sonra ortaya çıkan reaksiyon kuvveti değeri hesaplanmıştır. Sonlu elemanlar analizinde istenilen kuvvet değerinde analiz yapmak için ilk verilen yer değiştirme değeri referans yer değiştirme değeri olarak kullanılmıştır. Yapılan sonlu elemanlar analizi lineer-elastik analizler olduğu için uygulanmak istenilen kuvvete karşılık gelecek yer değiştirme değeri referans olarak verilen yer değiştirme değerinden ortaya çıkan reaksiyon kuvvetine göre tekrar hesaplanmıştır. Hesaplanan değer ikinci yer değiştirme vektörü olarak Şekil B.25'teki gibi kullanılmıştır. Böylelikle istenilen kuvvet değerinde yakınsama problemi yaşamadan Q yer değiştirme vektörü elde edilmiştir.

```

%Force Vector
F=zeros(3*NN,NS);
for i=1:NN
    if coord(i,4)==maxz
        for j=1:NS
            F(3*i,j)=F(3*i,j)+CCC*((DP/NS)*j);
        end
        for rrr=1:NRN(i,3)
            if global_stiffnes(2,sum(NRN(1:i-1,3))*3+2*NRN(i,3)+rrr)==global_stiffnes(1,sum(NRN(1:i-1,3))*3+2*NRN(i,3)+rrr)
                global_stiffnes(3,sum(NRN(1:i-1,3))*3+2*NRN(i,3)+rrr)=global_stiffnes(3,sum(NRN(1:i-1,3))*3+2*NRN(i,3)+rrr)+CCC;
            end
        end
    end
end
end

RF=zeros(NN,NS);
for i=1:NN
    if BCS(3*i,1)==0
        RF(i,j)=Q(3*i,ijk)*CCC;
    end
end
TRF=sum(RF(:, :));
DP2=(TF/TRF)*DP;

%Force Vector 2
F=zeros(3*NN,NS);
for i=1:NN
    if coord(i,4)==maxz
        for j=1:NS
            F(3*i,j)=F(3*i,j)+CCC*((DP2/NS)*j);
        end
    end
end

```

Referans Yer Değiştirme

İlk Reaksiyon Kuvveti

İkinci Yer Değiştirme

İkinci Kuvvet Vektörü

Şekil B.25: Yer değiştirme vektörünü hesaplayan algoritma.

Düğüm noktalarının yer değiştirme değerlerini içeren Q vektörü elde edildikten sonra her bir elemandaki birim şekil değiştirme ve gerilme değerleri hesaplanmıştır. Bunun için Şekil B.26'daki gibi her elemanın içerdiği düğüm noktalarının yer değiştirme değeri 24×1 boyutundaki w matrisine yazdırılmıştır.

```

for i=1:NE
    w(1,1)=Q(conn(i,2)*3-2,ijk);
    w(2,1)=Q(conn(i,2)*3-1,ijk);
    w(3,1)=Q(conn(i,2)*3,ijk);
    w(4,1)=Q(conn(i,3)*3-2,ijk);
    w(5,1)=Q(conn(i,3)*3-1,ijk);
    w(6,1)=Q(conn(i,3)*3,ijk);
    w(7,1)=Q(conn(i,4)*3-2,ijk);
    w(8,1)=Q(conn(i,4)*3-1,ijk);
    w(9,1)=Q(conn(i,4)*3,ijk);
    w(10,1)=Q(conn(i,5)*3-2,ijk);
    w(11,1)=Q(conn(i,5)*3-1,ijk);
    w(12,1)=Q(conn(i,5)*3,ijk);
    w(13,1)=Q(conn(i,6)*3-2,ijk);
    w(14,1)=Q(conn(i,6)*3-1,ijk);
    w(15,1)=Q(conn(i,6)*3,ijk);
    w(16,1)=Q(conn(i,7)*3-2,ijk);
    w(17,1)=Q(conn(i,7)*3-1,ijk);
    w(18,1)=Q(conn(i,7)*3,ijk);
    w(19,1)=Q(conn(i,8)*3-2,ijk);
    w(20,1)=Q(conn(i,8)*3-1,ijk);
    w(21,1)=Q(conn(i,8)*3,ijk);
    w(22,1)=Q(conn(i,9)*3-2,ijk);
    w(23,1)=Q(conn(i,9)*3-1,ijk);
    w(24,1)=Q(conn(i,9)*3,ijk);
end

```

Şekil B.26: w matrisinin oluşturulması.

Aynı eleman döngüsü içerisinde B matrisi 8 integrasyon noktası için tekrar hesaplanmış ve w matrisiyle çarpılarak o eleman için birim şekil değiştirme değerleri

hesaplanmış ve Şekil B.27’de gösterildiği gibi her integrasyon noktasından elde edilen birim şekil değiştirme değerleri *epsilon* matrisinde arka arkaya toplanmıştır. Bu matris her yeni elemanda sıfırlanmaktadır.

```

epsilon=zeros(6,1);
for ip=1:8
    r=IP(ip,1);
    s=IP(ip,2);
    t=IP(ip,3);
end
%B
B=A*G;
epsilon=epsilon+B*w;
end
epsilon_ort(6*(i-1)+1:6*(i-1)+6,1)=epsilon/8;
epsilon_x(i,1)=epsilon_ort(i*6-5,1);
epsilon_y(i,1)=epsilon_ort(i*6-4,1);
epsilon_z(i,1)=epsilon_ort(i*6-3,1);
epsilon_yz(i,1)=epsilon_ort(i*6-2,1);
epsilon_xz(i,1)=epsilon_ort(i*6-1,1);
epsilon_xy(i,1)=epsilon_ort(i*6,1);

```

Ortalama
Birim Şekil
Değiştirme
Değerleri

Şekil B.27: Birim şekil değiştirme değerlerinin hesaplanması.

Şekil B.27’de integrasyon noktalarından *B* matrisinin hesaplanmasına kadar olan kısım daha önce verildiği için burada tekrar verilmemiştir. Tüm integrasyon noktalarından birim şekil değiştirme değerleri hesaplandıktan sonra *epsilon* matrisinin elemanları 8’e bölünerek ortalama birim şekil değiştirme değerleri hesaplanmış ve *epsilon_ort* matrisine kaydedilmiştir. Ortalama birim şekil değiştirme değerleri hesaplandıktan sonra her bir eleman için normal ve kayma şekil değiştirme değerleri matrisleri oluşturulmuştur. Ortalama birim şekil değiştirme matrisiyle *DD* malzeme matrisiyle çarpılarak ortalama gerilme değerleri her bir eleman için Şekil B.28’deki gibi hesaplanmıştır.

```

%D
DD=(E/((1+n)*(1-2*n)))*[1-n n n 0 0 0;n 1-n n 0 0 0;n n 1-n 0 0 0;
0 0 0 0.5-n 0 0;0 0 0 0 0.5-n 0;0 0 0 0 0 0.5-n];
s_ort(6*(i-1)+1:6*(i-1)+6,1)=DD*epsilon_ort(6*(i-1)+1:6*(i-1)+6,1);
sigma_x(i,1)=s_ort(i*6-5,1);
sigma_y(i,1)=s_ort(i*6-4,1);
sigma_z(i,1)=s_ort(i*6-3,1);
sigma_yz(i,1)=s_ort(i*6-2,1);
sigma_xz(i,1)=s_ort(i*6-1,1);
sigma_xy(i,1)=s_ort(i*6,1);

```

Şekil B.28: Gerilme değerlerinin hesaplanması.

Hesaplanan gerilme değerleri *s_ort* matrisine kaydedilmiştir. Buradan da her bir eleman için normal ve kayma gerilmeleri matrisleri oluşturulmuştur. Her bir eleman için elde edilen gerilme ve birim şekil değiştirme değerleri kullanılarak von Mises gerilme değerleri ve şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu Şekil B.29’daki gibi hesaplanmıştır.

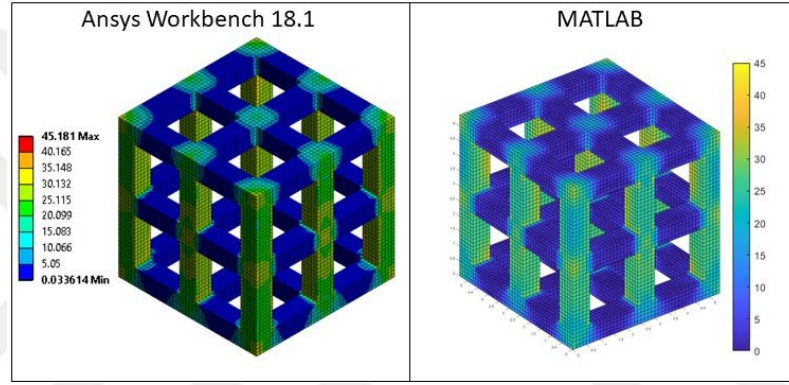
```

%Von Mises Stress
sigma_mises(i,1)=(0.5*((sigma_x(i,1)-sigma_y(i,1)).^2+(sigma_y(i,1)-sigma_z(i,1)).^2+(sigma_z(i,1)-sigma_x(i,1)).^2+6*(sigma_xy(i,1).^2+sigma_yz(i,1).^2+sigma_xz(i,1).^2))).^0.5;
%Strain Energy Density
U(i,1)=0.5*(sigma_x(i,1).*epsilon_x(i,1)+sigma_y(i,1).*epsilon_y(i,1)+sigma_z(i,1).*epsilon_z(i,1)+sigma_yz(i,1).*epsilon_yz(i,1)+sigma_xz(i,1).*epsilon_xz(i,1)+sigma_xy(i,1).*epsilon_xy(i,1));
end

```

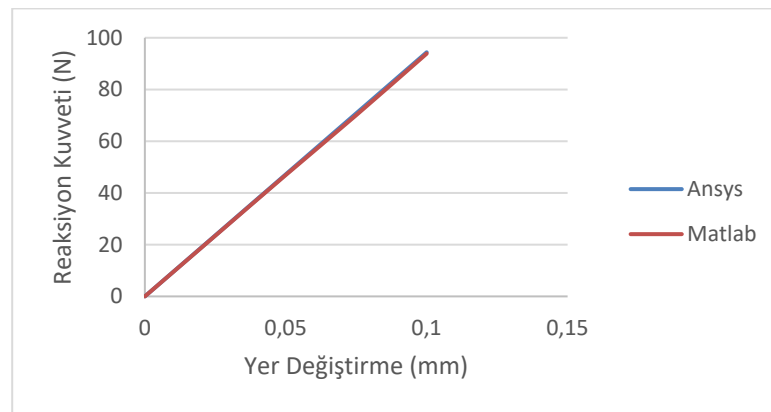
Şekil B.29: Von Mises gerilmesi ve şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu.

Von Mises gerilme ve şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu değerleri in silico modelde sonlu elemanlar analizinin çıktısı olarak kullanılacaktır. Elde edilen sonlu elemanlar algoritmasının doğruluğunu teyit etmek için Ansys Workbench 18.1 ticari sonlu elemanlar yazılımı kullanılmıştır. Aynı mesh boyutları ve sınır şartları kullanılarak sonuçlar birbiriyle kıyaslanmıştır.



Şekil B.30: Von Mises gerilme dağılımı.

Şekil B.30'da her iki sonlu elemanlar analizinden elde edilen von mises gerilme dağılımı verilmiştir. Görüldüğü üzere von mises gerilme dağılımları aynı çıkmıştır.

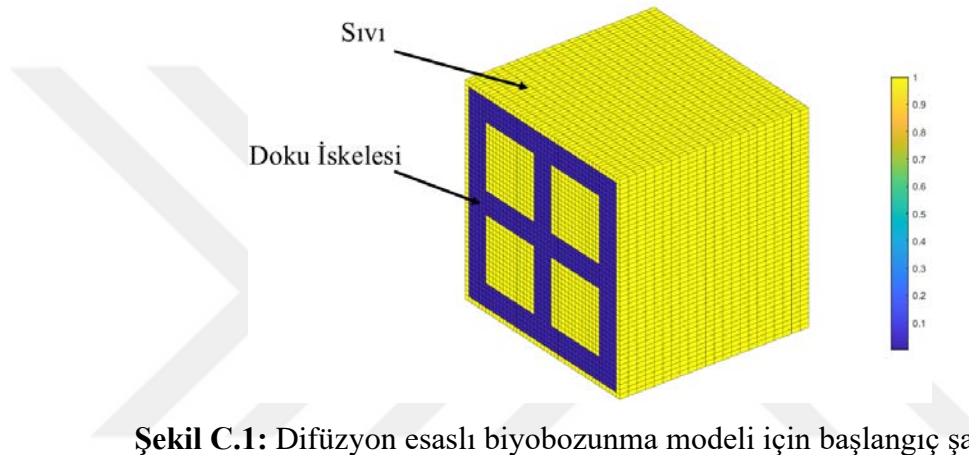


Şekil B.31: Reaksiyon kuvveti – yer değiştirme grafiği.

Şekil B.31'de Ansys ve Matlab' dan elde edilen reaksiyon kuvvetine karşılık yer değiştirme grafikleri verilmiştir. Değerler arasındaki maksimum fark %0,5' den daha az çıkmıştır.

EK C

Periyodik doku iskelelerinin biyobozunma davranışını difüzyon esaslı model kullanarak analiz etmek için MATLAB yazılımından faydalanılmıştır. İlk olarak zamana bağlı olarak doku iskelesi içerisindeki su konsantrasyonunu hesaplayabilmek için Denklem 2.6'da verilen difüzyon denklemi Denklem 2.10'daki sonlu farklar formuna çevrilmiştir. Ardından başlangıç ve sınır şartları altında difüzyon denklemi çevrimsel olarak çalıştırılmış ve her çevrimde doku iskelesi malzemesinin eleman eleman elastisite modülü değerleri hesaplanmıştır. Difüzyon esaslı biyobozunma modelinin MATLAB üzerinde nasıl çalıştığı adım adım aşağıdaki gibi sunulmuştur.



Şekil C.1: Difüzyon esaslı biyobozunma modeli için başlangıç şartları.

Şekil C.1'de difüzyon esaslı biyobozunma modelinin başlangıç şartları doku iskelesi ve sıvının ortadan kesit alınmış hali şeklinde verilmiştir. Başlangıçta doku iskelesini temsil eden elemanlarda hiç sıvı bulunmadığı için konsantrasyon 0 olarak ve sıvının konsantrasyonu da 1 olarak kabul edilmiştir. Buna göre mavi renkler doku iskelesini ve sarı renkler ise sıvıyı temsil etmektedir. Bu başlangıç şartlarını oluşturmak için şu adımlar izlenmiştir.

İlk olarak katı tasarım programında periyodik doku iskelesi tasarımı yapıldıktan sonra aynı merkezde olacak şekilde kenar uzunluğu 2 eleman boyundan daha uzun olacak şekilde içi dolu küp çizilmiştir. Bu iki geometri dosyası step formatında kaydedilmiştir.

İç i dolu küp rahatlıkla hexahedron elemanlarla meshlenebilmektedir. Fakat doku iskelelerini hexahedron elemanlarla meshlemek için Bölüm 2.4.1'deki adımlar izlenerek mesh işlemleri gerçekleştirilmiştir. Böylelikle her iki geometri içinde koordinat ve bağlantısallık tablosu elde edilmiştir.

İki ayrı geometriden elde edilen mesh verilerinde geometriler aynı merkezde tasarlandığı için ortak elemanlar vardır. Bunları tespit etmek için MATLAB ortamında her elemanın ağırlık merkezleri hesaplanıp iki ayrı mesh verisinde ortak elemanların olup olmadığı kontrol edilerek bu elemanların sıvı mı yoksa doku iskelesi elemanı mı olduğu belirlendikten sonra Şekil C.2’de verilen sıvının eleman bağlantısallık matrisine bir sütun daha ekleyip ortak elemanların 10. Sütununa 1 yazdırılmıştır. Böylelikle doku iskelesini temsil eden elemanlar sıvının eleman bağlantısallık matrisi üzerinden ayırt edilmiştir. Eleman bağlantısallık matrisinin 10. Sütununda sıfır yazan elemanlar ise sıvıyı temsil etmektedir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
514	514	1001	1002	1023	1022	560	561	582	581	1
515	515	1002	1003	1024	1023	561	562	583	582	1
516	516	1003	1004	1025	1024	562	563	584	583	1
517	517	1004	1005	1026	1025	563	564	585	584	1
518	518	1005	1006	1027	1026	564	565	586	585	1
519	519	1006	1007	1028	1027	565	566	587	586	1
520	520	1007	1008	1029	1028	566	567	588	587	0
521	521	1009	1010	1031	1030	568	569	590	589	0
522	522	1010	1011	1032	1031	569	570	591	590	1
523	523	1011	1012	1033	1032	570	571	592	591	1
524	524	1012	1013	1034	1033	571	572	593	592	1
525	525	1013	1014	1035	1034	572	573	594	593	1
526	526	1014	1015	1036	1035	573	574	595	594	1

Şekil C.2: Sıvının eleman bağlantısallık matrisi.

Elemanlar bağlantısallık matrisinde ayıklandıktan sonra başlangıç şartlarını tanımlamak için *C* isimli bir boş konsantrasyon matrisi tanımlanmıştır.

```

dx=0.0625; %Position Interval in x direction
dy=0.0625; %Position Interval in y direction
dz=0.0625; %Position Interval in y direction
aa=45; %Number of Elements in One Direction
bb=(coord(conn(1,6),2)-coord(conn(1,2),2))/dx;
%Boundary&Initial Conditions
C=zeros(bb*aa+1,bb*aa+1,bb*aa+1); %Concentration Matrix
%Concentration Matrix
C_el=zeros(NE,NC);

```

} *x, y ve z doğrultularındaki adım aralığı*
 → Bir kenardaki eleman sayısı
 → Bir elemanın içindeki aralık sayısı
 → 3 boyutlu konsantrasyon matrisi
 → Her bir elemanın merkezindeki konsantrasyon değeri

Şekil C.3: Konsantrasyon matrisi ve boyutlarının belirlenmesi.

Çözülecek difüzyon denklemi 3 boyutlu olduğu için konsantrasyon matrisi de 3 boyutlu matrisi olarak tanımlanmıştır. Sonlu fark denklemini çözmek için her eleman içindeki adım aralığımız ve bir kenardaki eleman sayısı *C* konsantrasyon matrisinin boyutlarını belirler. Şekil C.3’te tamamen sıfırlardan oluşan *C* konsantrasyon matrisinin boyutlarının MATLAB üzerinde nasıl belirlendiği gösterilmiştir. Ayrıca doku iskelesi elemanlarının moleküler ağırlık ve elastisite modülü değişimlerini

hesaplamak için her bir elemanın merkezindeki konsantrasyon değeri kullanılacaktır. Bu değerler de C_{el} isimli matrisin içine yazdırılacaktır.

Difüzyon modeli Şekil C.4'te gösterildiği gibi çevrimsel olarak çalışacaktır. Buradaki her çevrim 1 güne karşılık gelmektedir. Her çevrim başlangıcında sıvının konsantrasyon değeri 1 olarak güncellenmektedir.

```

for ijk=1:NC → Çevrim
tic
%Initial Conditions
for j=1:aa
    for k=1+bb*(j-1):(bb+1)+bb*(j-1)
        for m=1:aa
            for i=1+aa*(m-1):aa+aa*(m-1)
                if SF(i+aa^2*(j-1),ijk)==0;
                    C((bb*aa+1-bb-bb*(m-1)):(bb*aa+1-bb*(m-1)),1+bb*(j-1)+aa*(m-1)):(bb+1)+bb*(i-1-aa*(m-1)),k)=1;
                end
            end
        end
    end
end
end
end

```

Her bir çevrimde sıvı elemanlarının konsantrasyon matrisindeki değeri başlangıç şartı olarak 1 yazılmıştır.

Şekil C.4: Çevrimsel çalışan difüzyon modeli ve başlangıç şartları.

C konsantrasyon matrisi döngü başlamadan önce oluşturulduğu için döngü esnasında doku iskelesini temsil eden kısımlarda herhangi bir değer ataması yapılmamaktadır.

Döngü içerisinde konsantrasyondaki değişimlerin kaydedileceği $dCdt$ isimli boş matris Şekil C.5'te gösterildiği gibi tanımlanmıştır.

```

dCdt=zeros(aa*bb+1,aa*bb+1,aa*bb+1); → Konsantrasyonun zamana göre değişim matrisi
t=0:dt:t_final; %Time Step → Zaman adımı
for m=1:length(t)
    for i=2:aa*bb
        for j=2:aa*bb
            for k=2:aa*bb
                dCdt(i,j,k)=(alpha/dx^2)*(C(i+1,j,k)-2*C(i,j,k)+C(i-1,j,k))+
(alpha/dy^2)*(C(i,j+1,k)-2*C(i,j,k)+C(i,j-1,k)))+(alpha/dz^2)*(C(i,j,k+1)-2*C(i,j,k)+C(i,j,k-1));
            end
        end
    end
    C=C+dCdt*dt;
end

```

Difüzyon denkleminin sonlu farklar yöntemiyle çözümü

Şekil C.5: Difüzyon denkleminin çözümü.

Difüzyon denkleminin sonlu farklar yöntemi kullanılarak çözümü Şekil C.5'te gösterilmiştir. Bu şekilde o çevrimdeki doku iskelesi elemanlarındaki konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

Her elemanın merkezindeki konsantrasyon değerleri Şekil C.6'da gösterildiği gibi elde edildikten sonra bu konsantrasyon değerleri kullanılarak moleküler ağırlık hesaplamaları yapılmıştır.

```

for k=1:aa
    for j=1:aa
        for i=1+aa*(j-1)+aa^2*(k-1):aa+aa*(j-1)+aa^2*(k-1)
            C_el(i,ijk)=C(aa*bb+1-bb/2-bb*(j-1),1+bb/2+bb*(i-1)-
bb*aa*(j-1)-bb*aa^2*(k-1),1+bb/2+bb*(k-1));
        end
    end
end
end

```

Eleman merkezindeki konsantrasyon değerlerinin elde edilmesi

```

%Molecular Weight Calculation
for i=1:NE
    if SF(i,ijk)==1
        mw(i,ijk+1)=mw(i,ijk)-4000* C_el(i,ijk);
    end
end
end

```

Moleküler Ağırlığın Hesaplanması

Şekil C.6: Eleman merkezindeki konsantrasyon değerleri ve moleküler ağırlık hesaplaması.

Hesaplanan moleküler ağırlık değerleri eşik moleküler ağırlık değeriyle kıyaslanarak kütleli (bulk) bozunmanın meydana gelip gelmediği Şekil C.7’de gösterildiği gibi yapılmıştır. Eğer moleküler ağırlık değeri eşik değerin altına düşerse malzeme tipini tanımlayan matrisle 0 yazılmaktadır. Böylece bir sonraki çevrimde o eleman sıvı olarak hesaplamaya devam edilecektir.

```

%Changing from scaffold to fluid
for i=1:NE
    if SF(i,ijk)==1
        if mw(i,ijk)<mw0
            SF(i,ijk+1)=0;
        else
            SF(i,ijk+1)=1;
        end
    end
end
end

```

Kütleli (Bulk) bozunmanın kontrolü

```

%Elasticity Modulus Calculation
for i=1:NE
    if SF(i,ijk)==1
        Et(i,ijk)=E0*(mw(i,ijk)/mw0);
    else
        Et(i,ijk)=E_fluid;
    end
end
end

```

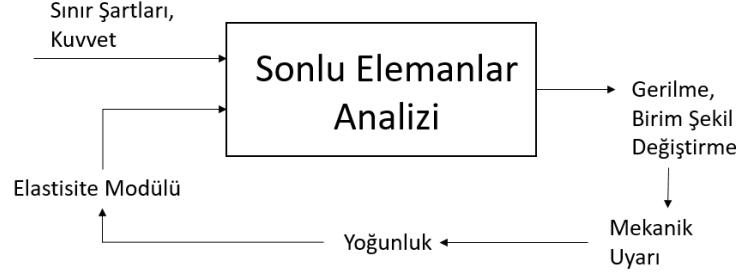
Elastisite modülünün hesaplanması

Şekil C.7: Kütleli (bulk) bozunma kontrolü ve elastisite modülü hesaplanması.

Moleküler ağırlık değerleri kullanılarak doku iskelesi elemanlarının elastisite modülü değerleri Şekil C.7’de gösterildiği gibi hesaplanmıştır.

EK D

Bölüm 2.7’de anlatılan kemik yeniden yapılanma modelinin sonlu elemanlar kodlarıyla beraber döngüsel olarak çalışma algoritması Şekil D.1’de verilmiştir.



Şekil D.1: Kemik yeniden yapılanma algoritması.

Şekil D.1’de de görüldüğü üzere kemik dokusunu temsil eden elemanların gerilme ve birim şekil değiştirme sonuçları kullanılarak birim şekil değiştirme enerjisi yoğunluğu hesaplanmıştır. Bu değer kemik dokusunu temsil eden her bir elemanın yoğunluğuna bölünerek birim kemik kütlesi için şekil değiştirme enerjisi hesaplanmış olup mekanik uyarı olarak adlandırılmaktadır. Mekanik uyarı değerine göre kemik yeniden yapılanma modeli kullanılarak kemik dokusunu temsil eden elemanların yoğunlukları hesaplanmıştır. Bu yoğunluk değerleri kullanılarak bir sonraki döngü için elastisite modülü değerleri hesaplanarak elastisite modülü matrisine kaydedilmiştir. Bunlar MATLAB ortamında şu şekilde kodlanmıştır.

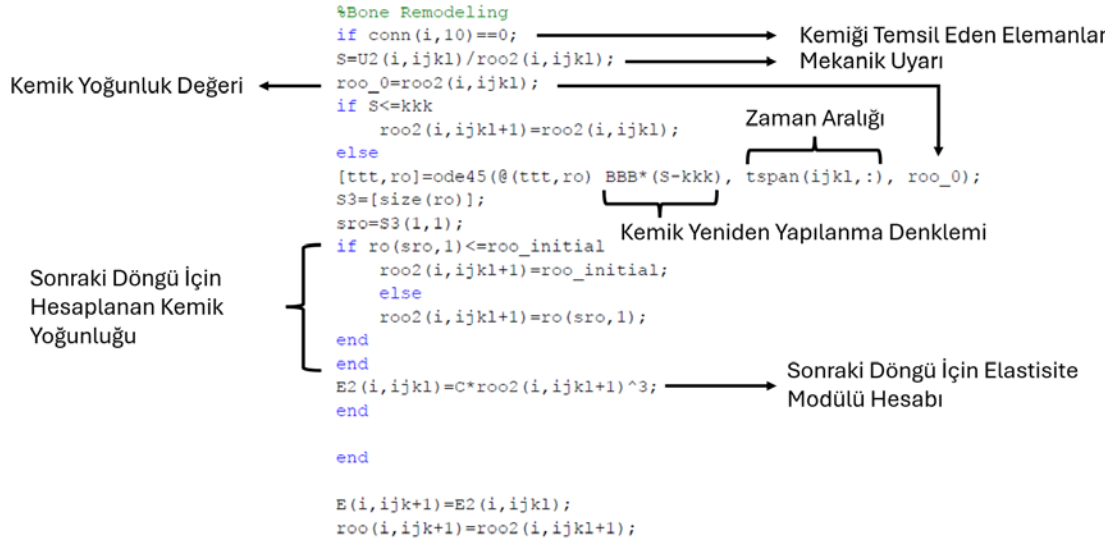
```
%Remodeling Constants
BBB=25000; %constant
kkk=4e-10; %threshold value
%delta=0.20;
tspan=[0 LT(1,1);LT(1,1) LT(1,2)];
C=3750;
roo_initial=0.1;
roo=zeros(NE,NC+1);
for i=1:NE
    if conn(i,10)==0
        roo(i,1)=roo_initial;
    end
end
```

Sabit
Eşik Değer
Zaman Aralığı
Başlangıç Kemik Yoğunluğu
Kemik Yoğunluğu Matrisi

Başlangıç Kemik Yoğunluk Değerlerinin Atanması

Şekil D.2: Kemik yeniden yapılanma katsayılarının tanımlanması.

Kemik yeniden yapılanma modelinde kullanılan katsayıların MATLAB ortamında tanımlanması Şekil D.2’de gösterildiği gibi yapılmıştır.

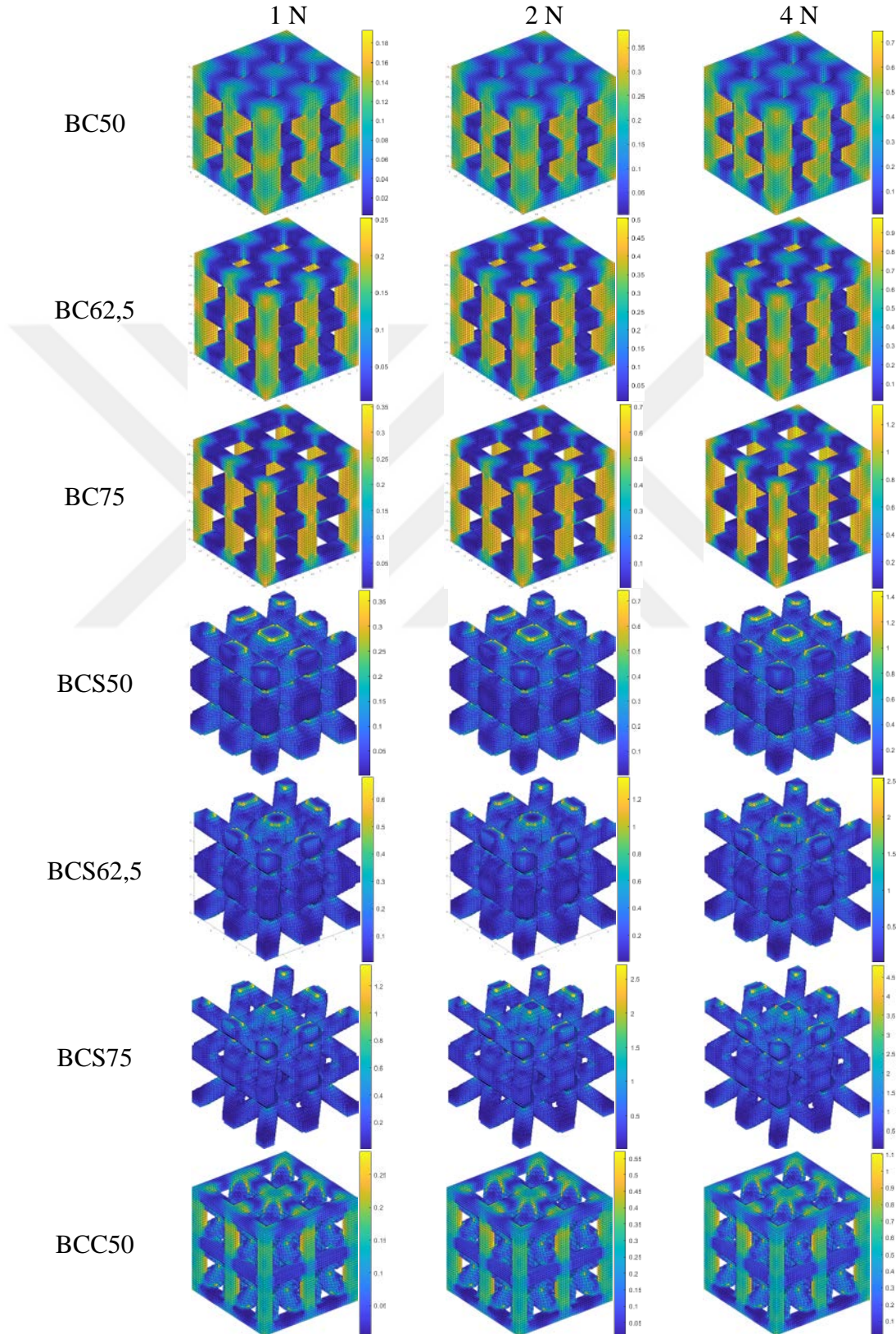


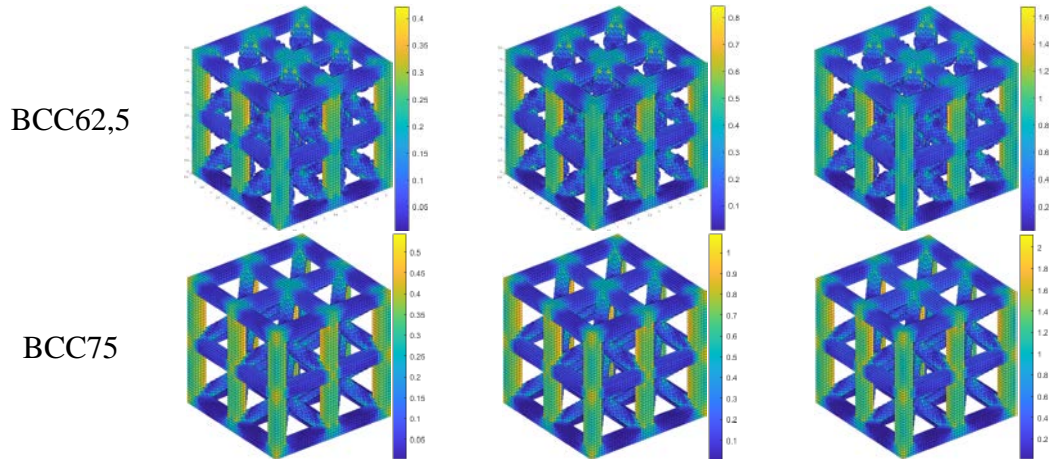
Şekil D.3: Kemik yeniden yapılanma modelinin çözümü.

Denklem 2.14'te verilen kemik yeniden yapılanma modeli MATLAB ortamında Şekil D.3'te gösterildiği gibi çözülmüştür. Kemik yeniden yapılanma denklemi MATLAB'ın adi diferansiyel denklem çözme toolbox'ı olan ode45 fonksiyonu kullanılarak hesaplanmıştır. Bu denklemden her bir döngüdeki kemik yoğunlukları hesaplanarak kaydedilmiştir.

EK E

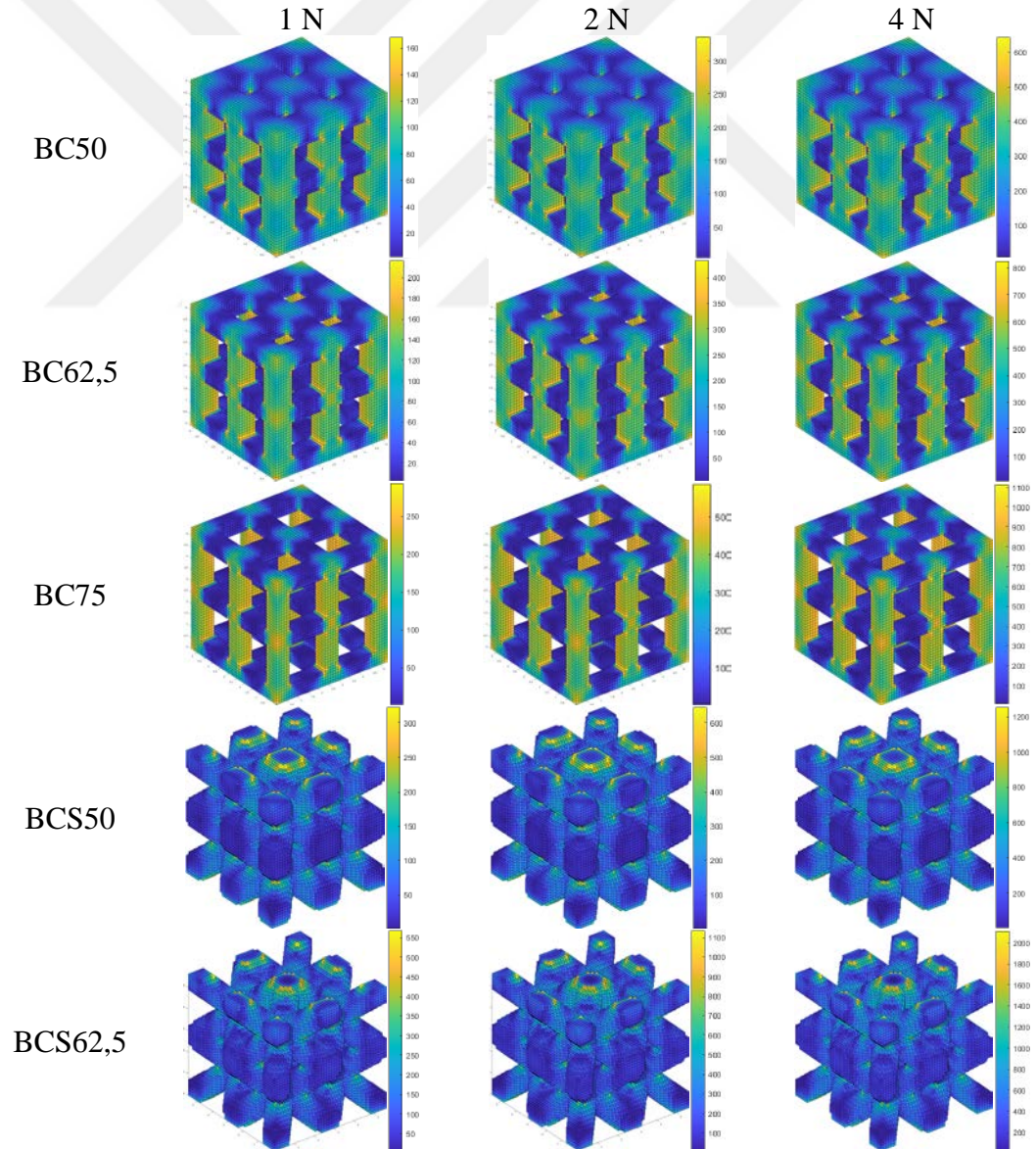
Periyodik doku iskelelerinin 1 N, 2 N ve 4 N yük altındaki Von Mises gerilme dağılımları Şekil E.1’de verilmiştir.

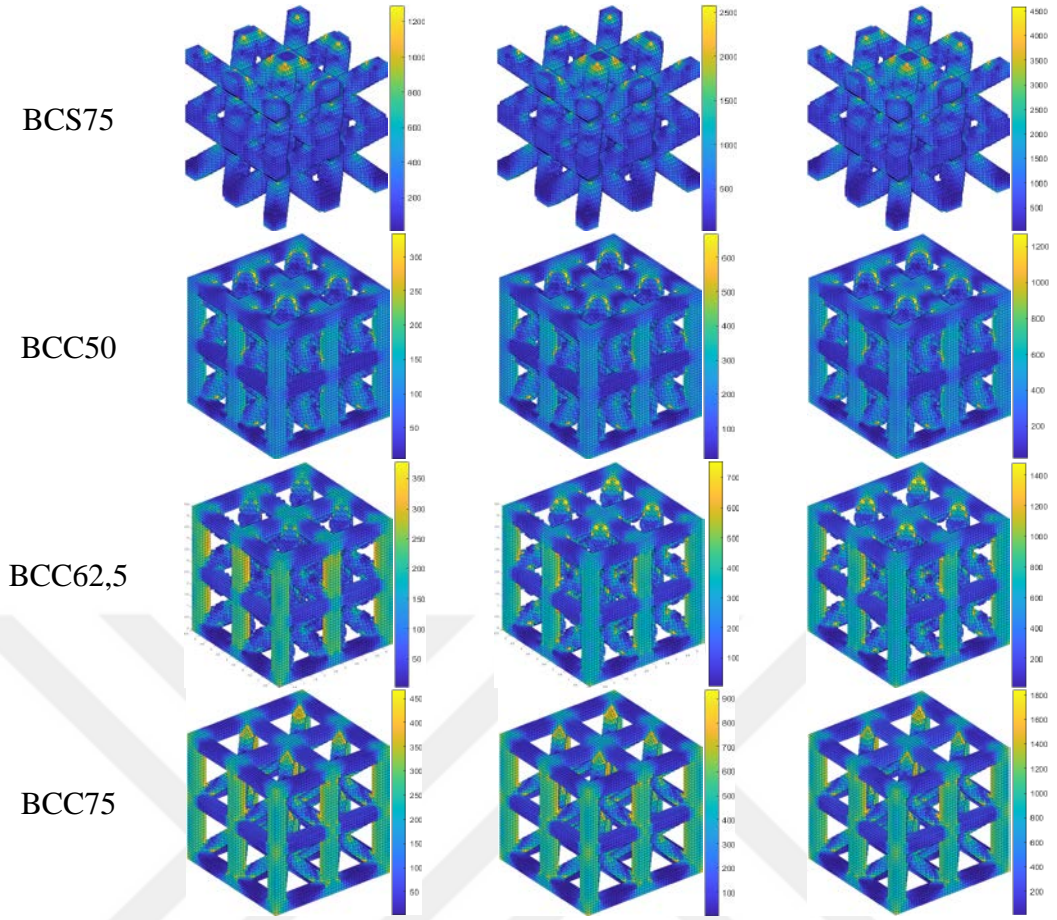




Şekil E.1: Periyodik doku iskelelerinin von mises gerilme dağılımları.

Periyodik doku iskelelerinin 1 N, 2 N ve 4 N yük altındaki eş değer birim şekil değiştirme dağılımları Şekil E.1’de verilmiştir.

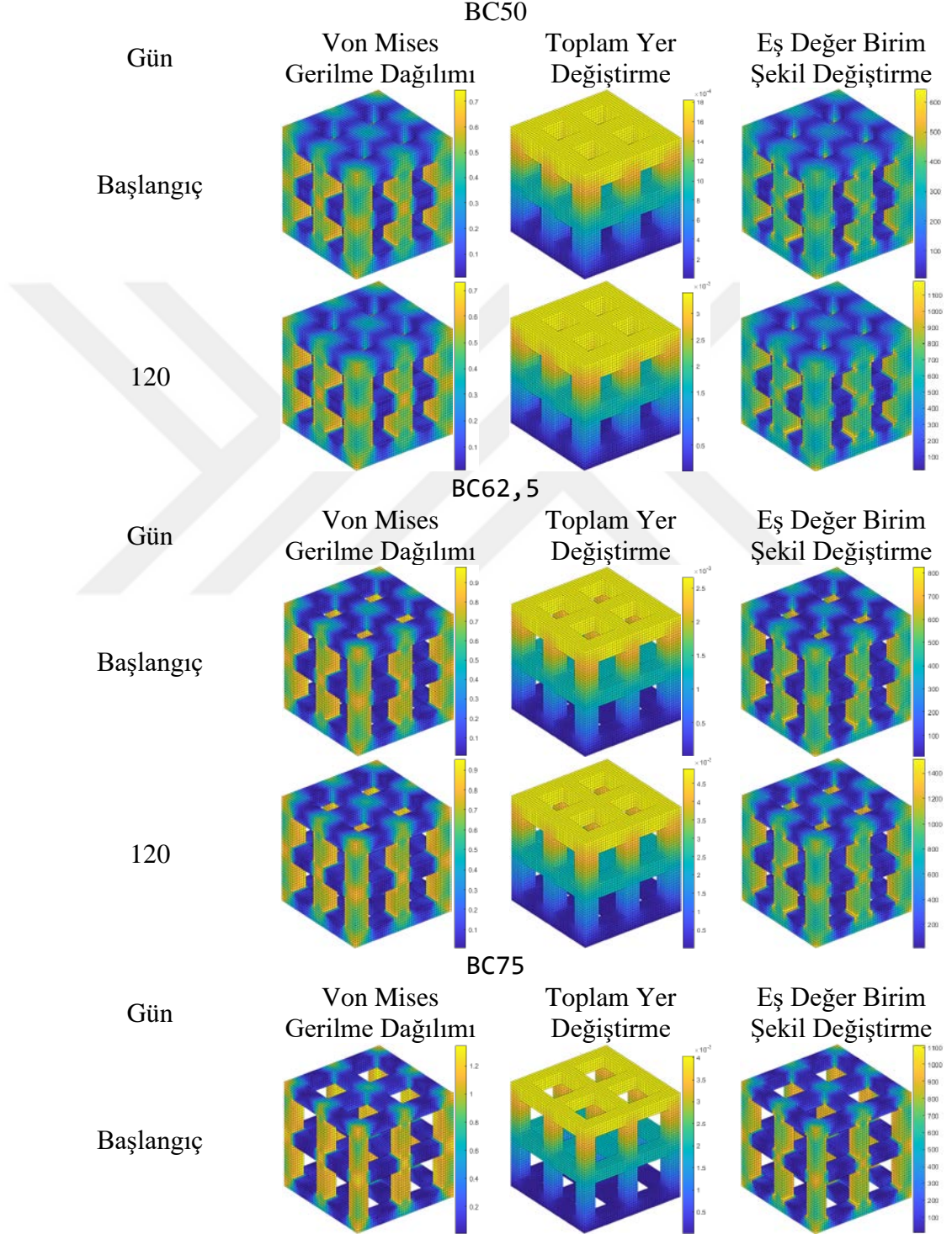




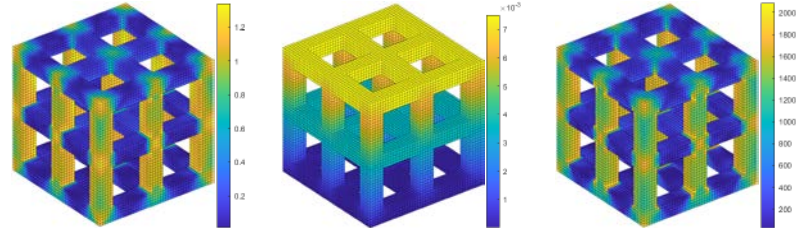
Şekil E.2: Periyodik doku iskelelerinin eş değer birim şekil değiştirme dağılımları.

EK F

4 N mekanik yük altında birinci dereceden kinetik biyobozunma modelinden elde edilen başlangıç ve 120. günün sonundaki Von Mises gerilme, toplam yer değiştirme ve eş değer birim şekil değiştirme dağılımları Şekil F.1’de verilmiştir.



120



BCS50

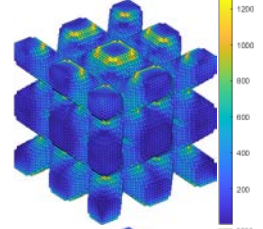
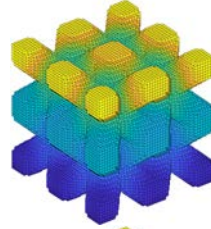
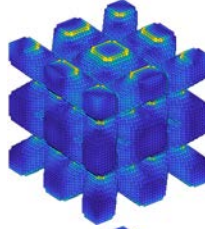
Gün

Von Mises Gerilme Dağılımı

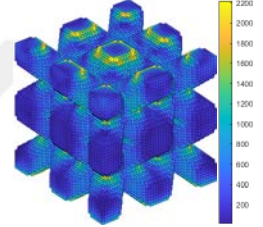
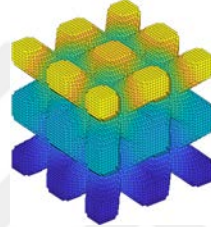
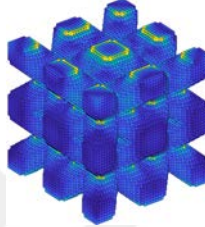
Toplam Yer Değişirme

Eş Değer Birim Şekil Değişirme

Başlangıç



120



BCS62,5

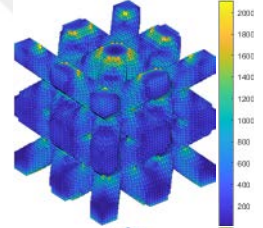
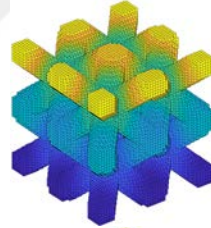
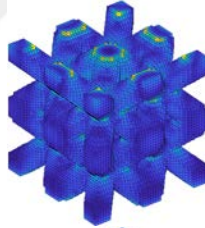
Gün

Von Mises Gerilme Dağılımı

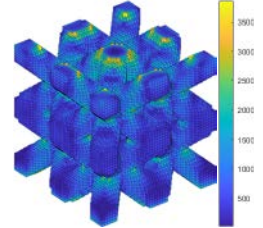
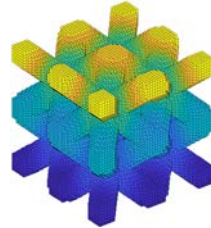
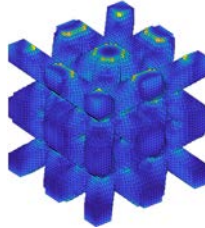
Toplam Yer Değişirme

Eş Değer Birim Şekil Değişirme

Başlangıç



120



BCS75

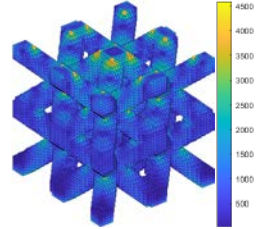
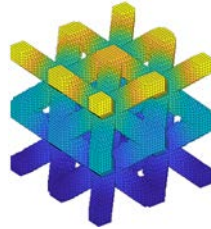
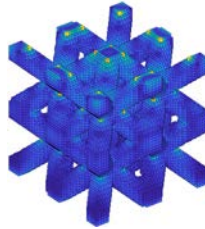
Gün

Von Mises Gerilme Dağılımı

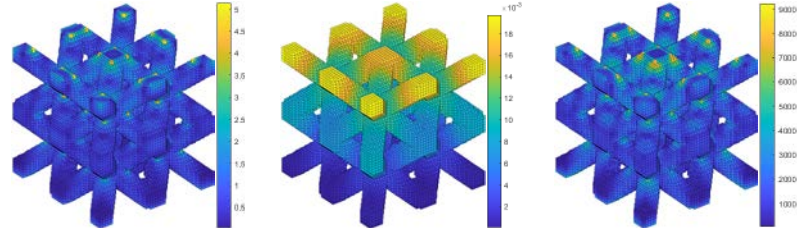
Toplam Yer Değişirme

Eş Değer Birim Şekil Değişirme

Başlangıç



120



BCC50

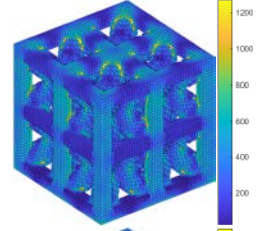
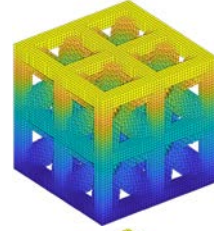
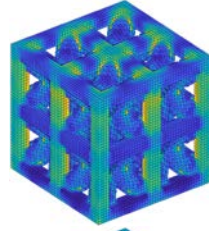
Gün

Von Mises Gerilme Dağılımı

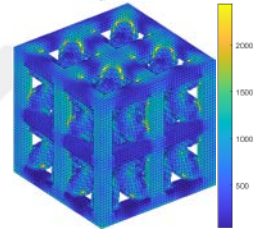
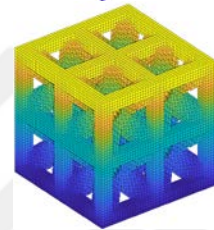
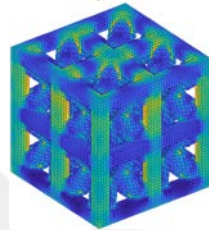
Toplam Yer Değişirme

Eş Değer Birim Şekil Değişirme

Başlangıç



120



BCC62,5

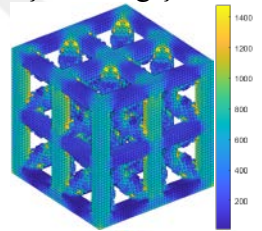
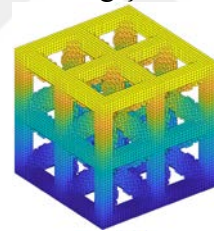
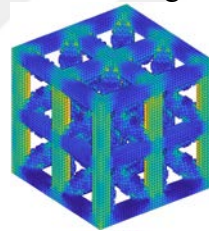
Gün

Von Mises Gerilme Dağılımı

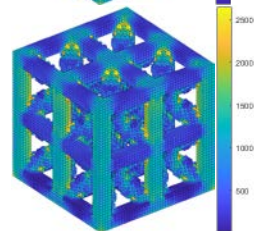
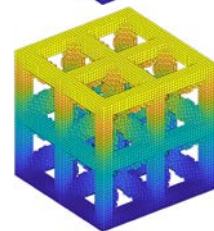
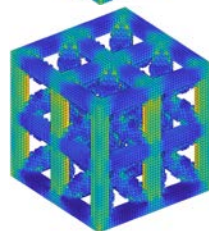
Toplam Yer Değişirme

Eş Değer Birim Şekil Değişirme

Başlangıç



120



BCC75

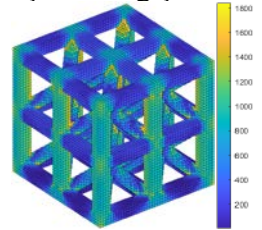
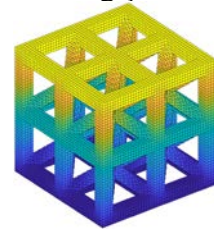
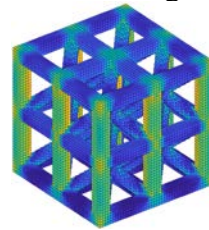
Gün

Von Mises Gerilme Dağılımı

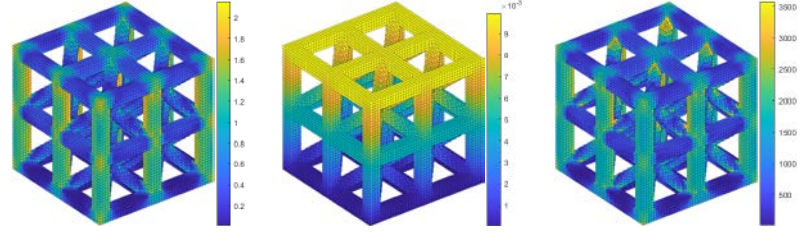
Toplam Yer Değişirme

Eş Değer Birim Şekil Değişirme

Başlangıç



120

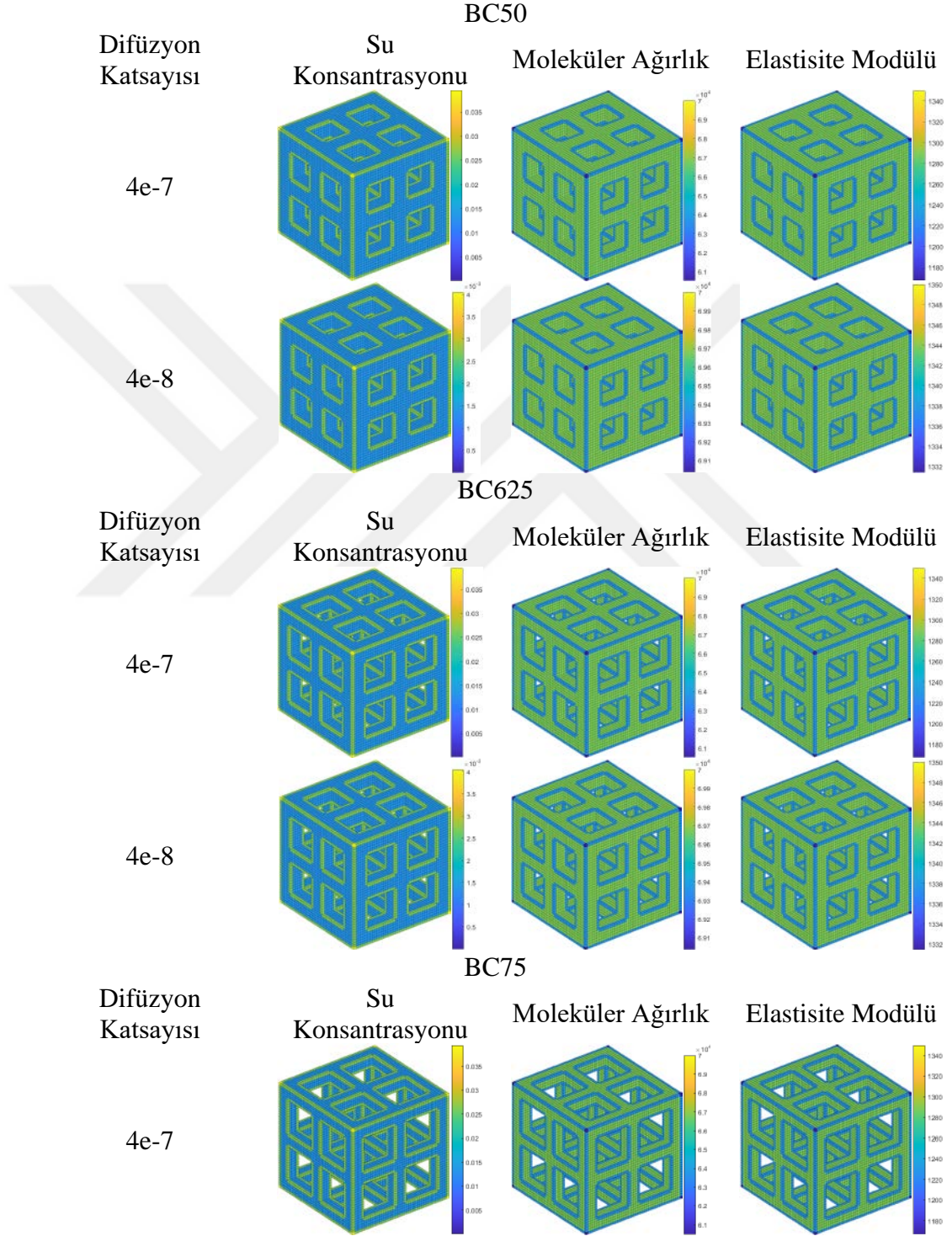


Şekil F.1: Periyodik doku iskelelerinin birinci dereceden kinetik biyobozunma analizi sonucu elde edilen Von Mises gerilme, toplam yer değıştirme ve eş değır birim şekil değıştirme dağılımları.

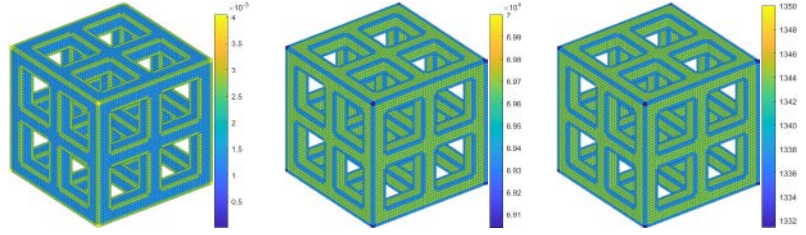


EK G

Periyodik doku iskelelerinin 120. günün sonunda difüzyon esaslı biyobozunma modeli kullanılarak $4e-7$ ve $4e-8$ difüzyon katsayıları için elde edilen su konsantrasyonu, moleküler ağırlık ve elastisite modülü dağılımları Şekil G.1’de verilmiştir.



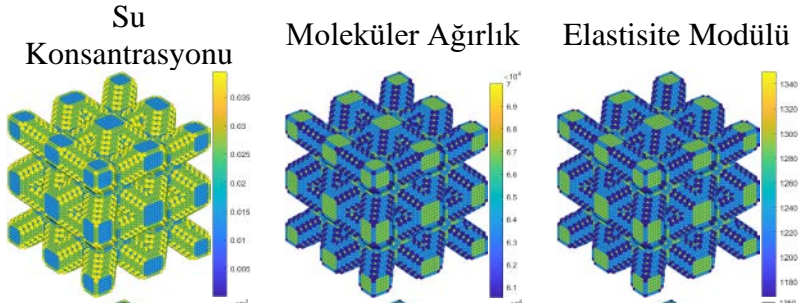
4e-8



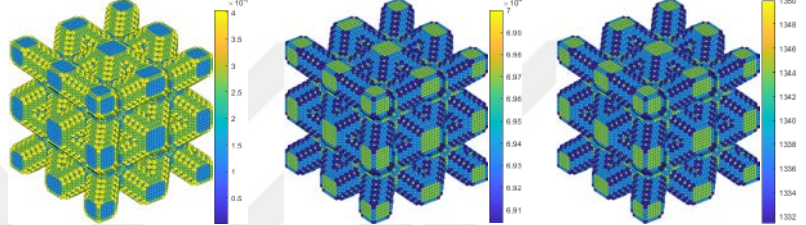
BCS50

Difüzyon Katsayısı

4e-7



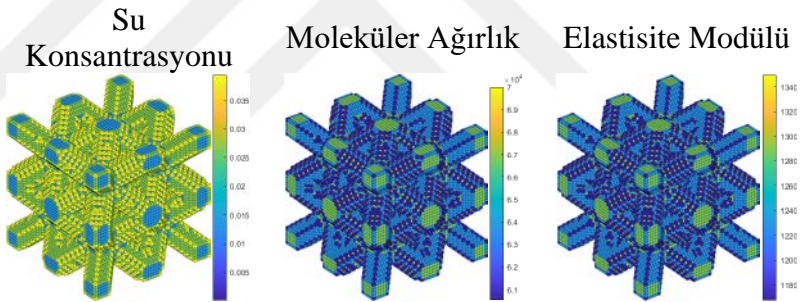
4e-8



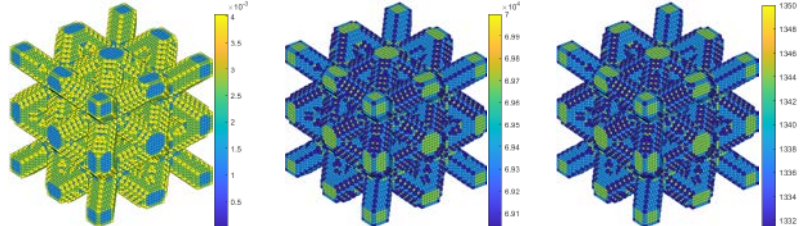
BCS625

Difüzyon Katsayısı

4e-7



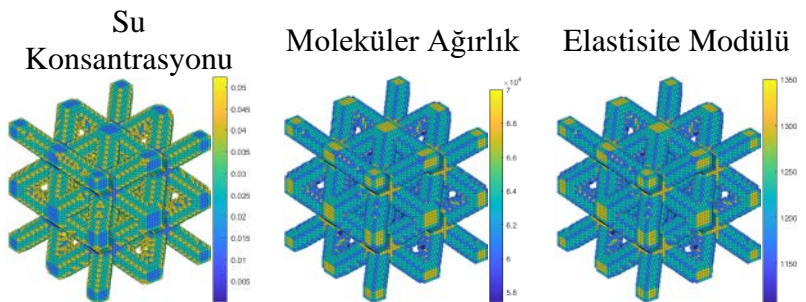
4e-8



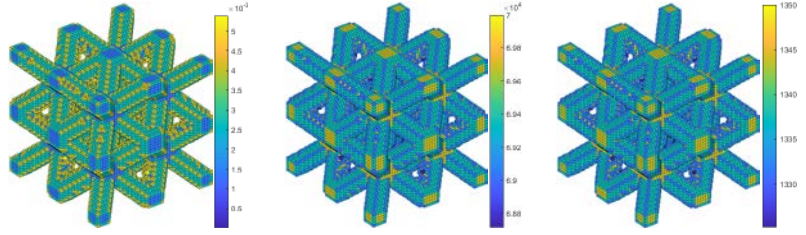
BCS75

Difüzyon Katsayısı

4e-7



4e-8



BCC50

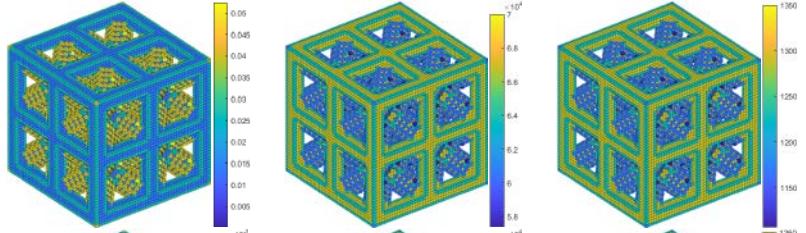
Difüzyon Katsayısı

Su Konsantrasyonu

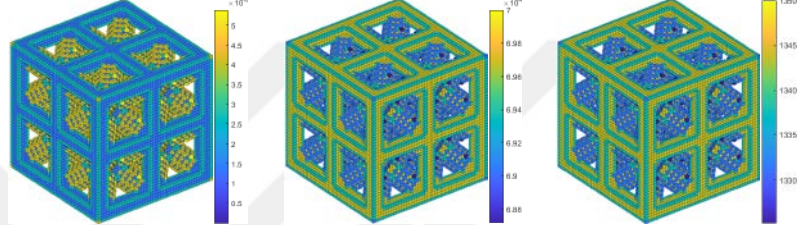
Moleküler Ağırlık

Elastisite Modülü

4e-7



4e-8



BCC625

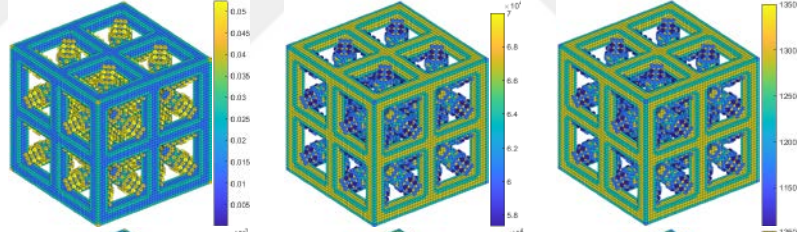
Difüzyon Katsayısı

Su Konsantrasyonu

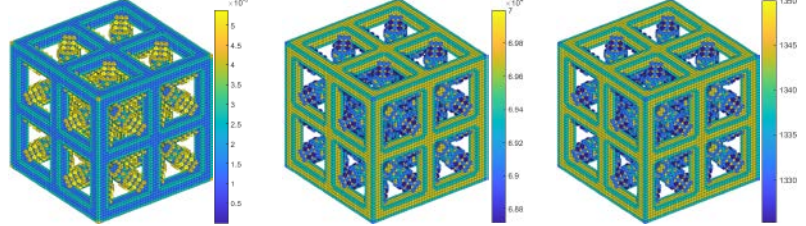
Moleküler Ağırlık

Elastisite Modülü

4e-7



4e-8



BCC75

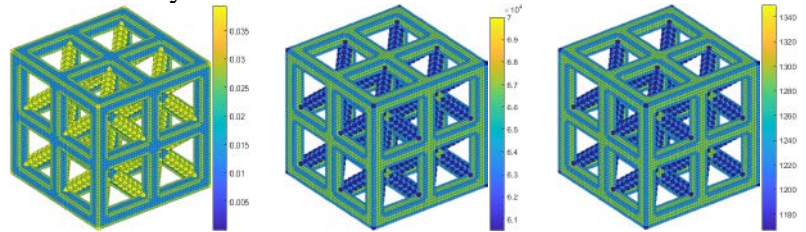
Difüzyon Katsayısı

Su Konsantrasyonu

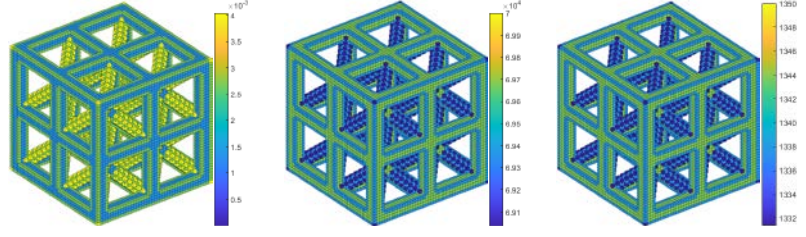
Moleküler Ağırlık

Elastisite Modülü

4e-7



4e-8



Şekil G.1: Periyodik doku iskelelerinin difüzyon esaslı biyobozunma analizi sonucu elde edilen su konsantrasyonu, moleküler ağırlık ve elastisite modülü dağılımları.

