

**POLİÜRETAN TABANLI KEMİK YAPIŞTIRICISI
FORMÜLASYONLARI**

**POLYURETHANE BASED BONE ADHESIVE
FORMULATIONS**

MERYEM ERKEN

DOÇ. DR. HALİL MURAT AYDIN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

**POLYURETHANE BASED BONE ADHESIVE
FORMULATIONS**

**POLİÜRETAN TABANLI KEMİK YAPIŞTIRICISI
FORMÜLASYONLARI**

MERYEM ERKEN

ASSOC. PROF. DR. HALİL MURAT AYDIN

Supervisor

Submitted to Institute of Sciences of Hacettepe University
as a Partial Fulfillment to the Requirements
for the Award of the Degree of Master of Science
in Bioengineering

2018

MERYEM ERKEN'in hazırladığı “**Poliüretan Tabanlı Kemik Yapıştırıcısı Formülasyonları**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İbrahim VARGEL
Başkan



Doç. Dr. Halil Murat AYDIN
Danışman



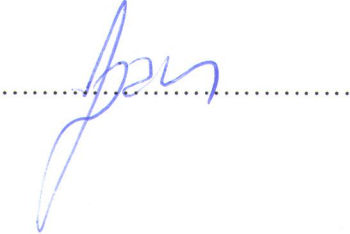
Doç. Dr. Memed DUMAN
Üye



Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN
Üye



Doç. Dr. Sedat ODABAŞ
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin 04.07.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım taktirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

04 / 07 / 2019.


(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Meryem ERKEN



Canım Aileme...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahribat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

14/06/2018



MERYEM ERKEN

ÖZET

POLİÜRETAN TABANLI KEMİK YAPIŞTIRICISI FORMÜLASYONLARI

Meryem ERKEN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik A.D.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Halil Murat AYDIN

Haziran 2018, 84 sayfa

Günümüzde milyonlarca insan trafik kazaları, günlük yaralanmalar, spor yaralanmaları gibi pek çok sebebe bağlı olarak kemik yaralanmasına bağlı tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Sağlık alanında kemik kırıklarının stabilize edilmesi için; alçı kullanılması, harici stabilizasyon, plakalar ve vidaların kullanılması gibi yöntemler vardır. Ancak bu yöntemler her türde kemik kırığı için uygun değildir. Kırıkların düzensiz bir yüzeyde, ince kemikte, parçalanmış kemikte veya hassas dokulara yakın olduğu durumlarda sert doku yapıştırıcılarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla bu tez çalışması kapsamında kemik dokularını birbirine yapıştıracak poliüretan bazlı kemik yapıştırıcısı ve hasarlı bölgede kemik doku oluşumunu destekleyecek poliüretan ve seramikten oluşan kompozit doku iskelelerinin üretilmesi planlanmıştır. Bu şekilde tamamen sentetik yollarla hazırlanmış osteokondüktif ve osteoindüktif özellikte, adezyon özelliği iyi, defekt bölgesinin şekline göre biçimlendirilebilen kemik yapıştırıcı ve greft formülasyonlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla tezin ilk aşamasında cam bir reaktör içerisinde poliüretan kemik yapıştırıcısı ve farklı partikül boyutunda (0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm) ve ağırlıkça farklı yüzdelerde (%20, %30 ve %40) beta-trikalsiyum fosfat (β -TCP) partikülleri içeren poliüretan tabanlı kompozit doku iskeleleri hazırlanmıştır. Tezin ikinci aşamasında hazırlanan doku iskelelerinde bulunan fonksiyonel grupların tespit edilmesi amacıyla

Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ve Hidrojen-Nükleer Manyetik Rezonans (^1H -NMR) analizleri gerçekleştirilmiş ve istenilen poliüretan yapısının sentezlendiği doğrulanmıştır. Malzemenin termal davranışı diferansiyel kalorimetri (DSC) analizi ile karakterize edilmiştir. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT) ile doku iskelelerinin %90'ın üstünde gözenekliliğe sahip olduğu, gözenekler arasında bağlantısalılık olduğu, organik ve inorganik fazların birbiri ile iyi entegre olduğu ve β -TCP partiküllerinin yapı içinde homojen dağıldığı gözlenmiştir. Ayrıca grupların yaklaşık $267 \pm 25 \mu\text{m}$ 'lik bir ortalama gözenek boyutuna sahip olduğu tespit edilmiştir.

Doku iskelesi adaylarının mekanik dayanımlarını belirlemek için yapılan basma testlerinde en yüksek basma dayanımını gösteren grubun 1-2 mm partikül boyutunda %40 (a/a) oranında β -TCP içeren grup olduğu görülmüştür. Ayrıca ilave edilen β -TCP oranı arttıkça basma dayanımının arttığı gözlenmiştir.

Hazırlanan poliüretan tabanlı kemik yapıştırıcısının kemiğe yapışma mukavemetini belirlemek amacıyla kırık sığır kaburga kemikleri yapıştırılarak mekanik çekme testi yapılmış ve malzemenin yapışma mukavemeti 1,34 MPa olarak tespit edilmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında ise hazırlanan PU/ β -TCP doku iskelelerine MG63 insan osteosarkoma hücre hattı ekilerek *in vitro* ortamda hücre kültürü analizleri gerçekleştirilmiş, Alamar Mavisi yöntemi ile hücre canlılığı ve proliferasyonu tayin edilmiştir. Gruplar arasında 1-2 mm partikül boyutunda %40 (a/a) oranında β -TCP içeren grupta en yüksek hücre canlılığı değerleri gözlenmiş ve yine bu grup hücre çoğalmasını destekleme yönünden diğer gruplara göre daha başarılı bulunmuştur. ISO 10993-2 standardı gereğince elüsyon yöntemiyle gerçekleştirilen sitotoksosite analizi ile %85,75 hücre canlılığı gözlenmiş ve üretilen malzemelerin toksik olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: kemik yapıştırıcısı, poliüretan, seramik, beta-trikalsiyum fosfat, kemik grefti, kemik defektleri

ABSTRACT

POLYURETHANE BASED BONE ADHESIVE FORMULATIONS

Meryem ERKEN

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

June 2018, 84 pages

Millions of people are in need of bone injury treatment for many reasons such as traffic accidents, daily injuries, sports injuries. For the stabilization of bone fractures in the health field; plastering, external stabilization, the use of plates and screws. However, these methods are not suitable for all types of bone fractures. Hard tissue adhesives are needed when the fractures are on an irregular surface, in thin bones or in broken bones proximity to sensitive tissues. For this purpose, it is planned to develop polyurethane based bone adhesive to adhere bone tissues to each other and composite tissue scaffolds consisting of polyurethane and ceramic to support bone tissue formation in damaged area. In this way, it is aimed to develop osteoconductive and osteoinductive bone adhesives and graft formulations which can be shaped according to the shape of the defect area. For this purpose, in the first step of the thesis, polyurethane bone adhesive and tissue scaffold including different size (0,5-1 mm, 1-2 mm and 2-4 mm) and different percentages (20%, 30% and 40% by weight) beta-tricalcium phosphate were prepared. In the second step of the thesis, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Hydrogen-Nuclear Magnetic Resonance (^1H -NMR) analyzes were performed to determine the functional groups present in the tissue scaffold and the synthesis of the desired polyurethane structure was verified. The thermal behavior of the material is characterized by differential scanning calorimetry (DSC) analysis. By using scanning electron microscopy (SEM) and micro-computerized tomography (μ -CT), it is

observed that the tissue scaffolds have porosity above 90%, the organic and inorganic phases are well integrated with each other and the homogeneous distribution of β -TCP particles in the structure. It was also found that average pore size of the groups are about $267 \pm 25 \mu\text{m}$.

In the compression tests, performed to determine the mechanical strength of the tissue scaffold candidates, the highest compressive strength was found in the group including 1-2 mm particle size with 40% β -TCP. Also it has been observed that increasing the TCP ratio increases the compression strength.

In order to determine the adhesion strength of the polyurethane based bone adhesive, the fractured bovine rib bones were glued and subjected to mechanical tensile test, and the adhesive strength of the material was determined to be 1,34 MPa.

In the final stage of the thesis, in order to investigate *in vitro* performance of the polyurethane/ β -TCP scaffolds, MG63 human osteosarcoma cells were seeded onto polyurethane/ β -TCP tissue scaffolds. To investigate the cell viability and the proliferation Alamar Blue assay was performed. Among the groups, the highest cell viability values were observed in the group containing 40% (w/w) β -TCP with 1-2 mm particle size and this group was found to be more successful than the other groups due to supporting cell proliferation. Cytotoxicity analysis performed by means of the elution method according to ISO 10993-2 showed 85.75% cell viability. This result indicates that the materials are not toxic.

Keywords: bone adhesive, polyurethane, ceramic, beta-tricalcium phosphate, bone graft, bone defects

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar beni destekleyen, kendisiyle çalışma imkânı bulabildiğim ve Tez çalışmam boyunca tecrübe ve bilgileriyle bana yön veren değerli hocam Doç. Dr. Halil Murat Aydın'a;

Tez çalışmalarım boyunca deneylerimde yardımcı olan, çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerine başvurduğum ve hiçbir zaman benden destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Pezhman Hosseinian ve Atakan Tevlek'e;

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve desteklenmesinde çok büyük katkıları olan BMT Calsis Ailesi'ne,

Güleryüzleriyle ve yardımseverlikleriyle bana çok güzel bir çalışma ortamı yaratan sevgili laboratuvar arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olan, benden destek ve yardımlarını esirgemeyen Türk Patent ve Marka Kurumu'nda çalışan değerli mesai arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında yanımda olan, her zaman sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim annem Zeynep, ablam Çiğdem, abim Yılmaz'a ve özellikle tez çalışmam süresince karşılaştığım her sıkıntıda yardımına koşan canım babam Mustafa'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meryem Erken

2018, Ankara

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kemikğin Yapısı, Fonksiyonu ve Genel Özellikleri	4
2.1.1 Kemik Hücreleri	6
2.1.2 Kemik Matriksi	7
2.2 Kemik Oluşumu ve Resorpsiyonu	8
2.3 Kemik Rejenerasyonu.....	10
2.4 Doku Mühendisliği	11
2.5 Kemik Doku Mühendisliği ve Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler.....	13
2.5.1 Kemik Yapıştırıcıları	16
2.5.1.1 Poliüretanlar	19
2.5.1.2 Poli (metilmetakrilat) ve ilgili sistemler.....	20
2.5.1.3 Siyanoakrilatlar	20
2.5.1.4 Laktit-metakrilat tabanlı sistemler	21
2.5.1.5 Fibrin ve protein-aldehit sistemleri	22
2.5.1.6 Midye yapışkan proteinler ve mimetik polimerler	22
2.5.1.7 " Sandcastle tutkalı "	23

2.5.2	Kemik Graftleri.....	23
2.5.2.1	Otograftler	24
2.5.2.2	Allograftler	25
2.5.2.3	Demineralize Kemik Matriksi	25
2.5.2.4	Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP).....	26
2.5.2.5	Sentetik Graftler	26
3	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	28
3.1	Poliüretan Kemik Yapıştırıcısı ve β -TCP İçeren Doku iskelelerinin Hazırlanması.	28
3.2	Kemik Yapıştırıcısı ve Doku İskelesi Karakterizasyonu.....	33
3.2.1	Kimyasal ve Termal Karakterizasyon Analizleri.....	33
3.2.2	Mekanik Karakterizasyon Analizleri	33
3.2.3	Morfolojik Karakterizasyon Analizleri.....	35
3.2.4	<i>In vitro</i> Hücre Kültürü Testleri	36
4	DENEYSEL SONUÇLAR.....	38
4.1	Kemik Yapıştırıcısı Karakterizasyonu.....	38
4.2	Doku İskelesi Karakterizasyonu	41
4.3	<i>In vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	63
5	SONUÇLAR.....	68
	KAYNAKLAR.....	76
	ÖZGEÇMİŞ.....	84

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1 Tıbbi Kemik Yapıştırıcısı için Gereklikler	17
Çizelge 2.2 Kemik yapıştırıcılarının sentetik, biyolojik, güncel gelişmelerdeki sınıflandırılması.....	18
Çizelge 3.1 PU/ β -TCP sentezi için gerçekleştirilen ağırlıkça farklı yüzdelere sahip 0,5-1 mm β -TCP içeren deneylerde kullanılan kimyasal oranları	31
Çizelge 3.2 PU/ β -TCP sentezi için gerçekleştirilen ağırlıkça farklı yüzdelere sahip 1-2 mm β -TCP içeren deneylerde kullanılan kimyasal oranları	32
Çizelge 3.3 PU/ β -TCP sentezi için gerçekleştirilen ağırlıkça farklı yüzdelere sahip 2-4 mm β -TCP içeren deneylerde kullanılan kimyasal oranları	32
Çizelge 4.1 Poliüretan kemik yapıştırıcı ile yapıştırılmış sığır kaburga kemiğine ait çekme analizi sonuçları (σ : çekme dayanımı (F_{max}/A), F_{max} : maksimum kuvvet, dL : uzama, h_0 : yükseklik, S_0 : kesit alanı).....	40
Çizelge 4.2 β -TCP partikül boyutlarına göre doku iskelesi gözeneklilik özellikleri	42
Çizelge 4.3 Bileşiğin FTIR spektrumunda tayin edilen pikler	51
Çizelge 4.4 β -TCP içermeyen Poliüretan doku iskelesine ait basma analizi sonuçları.....	56
Çizelge 4.5 0,5-1 mm partikül boyutunda ağırlıkça üç farklı oranda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelelerine ait basma analizi sonuçları	57
Çizelge 4.6 1-2 mm partikül boyutunda ağırlıkça üç farklı oranda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelelerine ait basma analizi sonuçları	57
Çizelge 4.7 2-4 mm partikül boyutunda ağırlıkça üç farklı oranda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelelerine ait basma analizi sonuçları	58
Çizelge 4.8 Ağırlıkça üç farklı yüzde ve partikül boyutunda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelesine ait basma analizi sonuçları (E_{mod} : elastik modül).....	59
Çizelge 4.9 Ağırlıkça üç farklı yüzde ve partikül boyutunda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelesine ait basma analizi sonuçları (0,2 %'deki plastik deformasyon (N)).....	59

ŞEKİLLER

Şekil 2.1 Trabeküler ve kortikal kemik	4
Şekil 2.2 Kemik Hücreleri	6
Şekil 2.3 Olgun bir kemikteki çeşitli kemik hücreleri.....	7
Şekil 2.4 Endokondral kemikleşme	9
Şekil 2.5 İntramembranöz kemikleşme	10
Şekil 2.6 Kemik rejenerasyonu.....	11
Şekil 2.7 Doku mühendisliğinin temel prensibi	12
Şekil 3.1 Polimerik metilen difenil diizosiyanat kimyasal yapısı	29
Şekil 3.2 İzosiyanat ve poliol arasında gerçekleşen üretan reaksiyonu.....	30
Şekil 3.3 Çekme testine ait görüntü.....	34
Şekil 3.4 Basma testine ait görüntü	35
Şekil 4.1 Poliüretan kemik yapıştırıcısı ve sığır kaburga kemiğinin yapıştırılmadan önceki görüntüsü	39
Şekil 4.2 Sığır kaburga kemiğinin poliüretan kemik yapıştırıcısı ile yapıştırıldıktan hemen sonra (A) ve bir gün sonraki görüntüsü (B).....	39
Şekil 4.3 Poliüretan kemik yapıştırıcı ile yapıştırılmış sığır kaburga kemiğine ait çekme analizi grafiği.....	40
Şekil 4.4 1-2 mm partikül boyutunda β -TCP içeren PU/ β -TCP kompozit doku iskelesi yandan (A) ve üstten (B) görünüm	41
Şekil 4.5 PU/ β -TCP doku iskelelerine ait μ -CT görüntüleri	43
Şekil 4.6 0,5-1mm β -TCP içeren doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (A) 50, (B) 100, (C) 250, (D) 500X büyütme.....	44
Şekil 4.7 1-2 mm β -TCP içeren doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (A) 50, (B) 100, (C) 250, (D) 500X büyütme.....	45
Şekil 4.8 2-4 mm β -TCP içeren doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (A) 50, (B) 100, (C) 250, (D) 500X büyütme.....	46
Şekil 4.9 Kullanılan pMDI hammaddesi için FTIR spektrumu	48

Şekil 4.10 Kullanılan kaprolakton monomerinin FTIR spektrumu	48
Şekil 4.11 β -TCP'ye ait FTIR spektrumu.....	49
Şekil 4.12 β -TCP içermeyen poliüretan malzemeye ait FTIR spektrumu.....	49
Şekil 4.13 Ağırlıkça %20, %30 ve % 40 oranlarında 0,5-1 mm β -TCP içeren poliüretan tabanlı kompozit malzemeye ait FTIR spektrumu	50
Şekil 4.14 Ağırlıkça %20, %30 ve % 40 oranlarında 1-2 mm β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait FTIR spektrumu	50
Şekil 4.15 Ağırlıkça %20, %30 ve % 40 oranlarında 2-4 mm β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait FTIR spektrumu	51
Şekil 4.16 0,5-1 mm β -TCP içeren kompozit malzemeye ait ^1H -NMR spektrumu	53
Şekil 4.17 1-2 mm β -TCP içeren kompozit malzemeye ait ^1H -NMR spektrumu	53
Şekil 4.18 2-4 mm β -TCP içeren kompozit malzemeye ait ^1H -NMR spektrumu	54
Şekil 4.19 0,5-1 mm β -TCP içeren malzemeye ait DSC Diyagramı	55
Şekil 4.20 1-2 mm β -TCP içeren malzemeye ait DSC Diyagramı	55
Şekil 4.21 2-4 mm β -TCP içeren malzemeye ait DSC Diyagramı	56
Şekil 4.22 β -TCP içermeyen poliüretan doku iskelesine ait basma analizi grafiği	60
Şekil 4.23 0,5-1 mm boyutunda β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait karşılaştırmalı basma analizi grafiği.....	61
Şekil 4.24 1-2 mm boyutunda β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait karşılaştırmalı basma analizi grafiği.....	61
Şekil 4.25 2-4 mm boyutunda β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait karşılaştırmalı basma analizi grafiği.....	62
Şekil 4.26 Farklı partikül boyutlarında ağırlıkça %40 oranında β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait karşılaştırmalı basma analizi grafiği	62
Şekil 4.27 Farklı malzeme yüzeylerinde MG63 çoğalmasının zamana bağlı değişimi.....	64
Şekil 4.28 Farklı malzeme yüzeylerinde MG63 hücre davranışlarının zamana bağlı değişiminin taramalı elektron mikroskopisi yardımıyla görüntülenmesi	65

Şekil 4.29 Çalışma kapsamında üretilen PU/1-2 mm β -TCP (%40 a/a) doku iskelelerinin doz bağımlı sitotoksisite grafiği	67
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	alfa
β	beta
μ	mikro

Kısaltmalar

PU	Poliüretan
β -TCP	Beta-trikalsiyum fosfat
PMMA	Polimetilmetaakrilat
PEG	Polietilen glikol
PLLA	Poli(L-laktik asit)
PPG	Polipropilen glikol
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
HA	Hyluronik asit
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
DOPA	3,4-dihidroksifenilalanin
HDI	Hekzametilen diizosiyanat
TDI	Toluen diizosiyanat
pMDI	Polimerik metilen difenil diizosiyanat
BMP	Kemik morfojenik proteini
DKM	Demineralize kemik matriksi
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü

1 GİRİŞ

Dünyada her yıl trafik kazaları, spor aktiviteleri, günlük yaralanmalar ve bunun gibi nedenlerden binlerce hasta kemik yaralanması tedavisine ihtiyaç duymaktadır. Spinal, maksilofasiyal, kol ve bacak bölgelerindeki bu travmalar çeşitli metalik implantlar ile fiks edilirken, doğal/sentetik kemik greftleri ile desteklenmektedir. Otogreftlerin donör bölgede morbidite ve kaynak açısından sınırlı olma gibi dezavantajlarından ötürü sentetik kemik greftleri üzerine çalışmalar son yıllarda hızla artmaktadır.

Açık kalp ameliyatlarında açılan sternumun birleştirilmesi ya da travmalarda oluşan parçalı kırıkların yapıştırılmasında kullanılmak üzere sert doku yapıştırıcılarına ihtiyaç bulunmaktadır. Kemik dokularının yapışması için gereken malzeme, özellikle sternum gibi tüm iç organların bir arada durduğu göğüs kafesindeki basınca iyileşme ve yeni kemik arayüzünün oluşması sürecinde gereken mekanik kuvveti şu anda klinikte kullanılan metalik teller gibi sağlayabilmeli, biyouyumlu ve kolayca uygulanabilir olmalıdır. Bunların yanı sıra fazlaca bulunabilir olmalı, metalik teller gibi ucuz olabilmeli, metal tellerin yarattığı psikolojik ve estetik sorunları ortadan kaldıracak olmalıdır.

Bu malzemeler, doku iskeleleri olarak defekt doldurma endikasyonlarında da kullanılabilir. Dokunun iyileşmesi için gerekli temel bileşenler üç boyutlu, açık gözenek yapısında bir doku iskelesi ve bu doku iskelesi ile birlikte kullanılmak üzere diğer canlı yapısında bulunan sinyal molekülleridir. Başarılı bir kemik oluşumu için bu gereksinimlerin optimum bir şekilde birleştirilmesi gerekir. Bu tür doku iskeleleri, klinikte özellikle otojenik kemik miktarının yeterli olmadığı pek çok durumda yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu doku iskeleleri aynı zamanda çözünür bir takım inorganik kemik minerallerini de bünyelerinde bulundurmalıdır. Biyouyumlu, açık gözenek yapısında, esnek bir doku iskelesi, hücre proliferasyonu ve büyümesi, ardından da ekstraselüler matriks oluşumu yoluyla kemik iyileşmesi yolunda geçici bir ev vazifesi görecektir ve bu yolla kemik fonksiyonunu onaracak veya rejenere edecektir. Aynı zamanda malzeme/doku karışımının vaskülerize olmasına da yardımcı olacak şekilde tasarlanmalıdır. Malzemenin makro ve mikro özellikleri, temelde hücreleri canlı tutmaya, büyümelerine ve migrasyonlarına olanak tanımaya yardımcı olacak şekilde belirlenmiş olmalıdır.

Bunun yanında, bu tür kemik adezyon ve kohezyon özelliklerine sahip bir materyalin, beta-trikalsiyum fosfat gibi kemiğin inorganik matriks bileşenlerinden biri olan seramik

yapılarıyla birleştirilmesi ve bu yolla hazırlanacak kompozit yapıların doku yapıştırılması sırasında ara yüz rejenerasyonunda kullanılabilmesi açısından önem taşımaktadır.

Geleneksel sentetik kemik replasman tedavilerinde yer değiştirecek malzemenin düşük çekme gerilimi özellikleri ve kötü adezyon davranışlarından ötürü sorunlar bulunmaktadır. Yine biyolojik malzemelerin de kullanımında bir takım sorunlar gözlemlenmektedir. Bunların başında bozunmanın erken olması ve defekt alanında boşlukların oluşması yer almaktadır. Yine bazı kemik onarım materyalleri uygulandıklarında ciddi ekzotermik reaksiyonlar ile çevresinde nekroza sebebiyet verebilmektedirler. Genellikle bu ekzotermik reaksiyonlar süregelen bir polimerizasyon işleminde kür olma aşamasından kaynaklanmakta ve çok yüksek sıcaklıklar gözlenebilmektedir. Hızla (1-5 dakika) kür olan (set eden) geleneksel kemik onarım malzemelerinin bu tür ekzotermik reaksiyon oluşturma potansiyelleri yüksektir. Ayrıca, kemik onarımında kullanılacak malzemelerin hazırlanmasında kullanılan polimetilmetakrilat (PMMA) gibi malzemeler oldukça toksik olabilmektedir. Yine bir takım kandan mamul ürünler de kan kaynaklı patojenlerin bulaşması riskini beraberinde getirmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında yukarıda anlatılan gereksinimlere dayanarak kemik dokularını birbirine yapıştıracak poliüretan tabanlı kemik yapıştırıcısı ve hasarlı bölgede kemik doku oluşumunu destekleyecek poliüretan ve seramikten oluşan kompozit doku iskeleleri üretilmiştir. Oluşturulan bu kemik yapıştırıcılarının ve doku iskelelerinin, yapısal ve fiziksel özellikleri karakterize edilmiş ve *in vitro* performansları incelenmiştir. Doku iskelelerinin kesit ve yüzey görüntülerinin alınması ve seramik fazın dağılımının gözlenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, gözenek yapısının incelenmesi ve porozite değerlerinin belirlenmesi amacıyla mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT) analizi yapılmıştır. Doku iskelelerinin kimyasal analizi için Hidrojen-Nükleer Manyetik Rezonans (^1H -NMR) ve Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR)'den yararlanılmış, termal analizi için ise Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi yapılmıştır. Poliüretan kemik yapıştırıcısının kemiğe yapışma mukavemetini belirlemek amacıyla sığır kaburga kemikleri kullanılarak mekanik çekme testi yapılmıştır. Ayrıca doku iskelelerinin mekanik dayanımını belirleyerek poliüretan yapısına eklenebilecek en uygun beta-trikalsiyum fosfat miktarını belirlemek amacıyla basma testi yapılmıştır.

Son olarak, karakterizasyonu tamamlanan doku iskelesi adaylarından β -TCP içermeyen ve en yüksek oranda (%40 a/a) β -TCP içeren gruplara MG63 insan osteosarkoma hücre hattı ekilerek hücre kültürü (*in vitro*) analizleri yapılmış, Alamar Mavisi yöntemi ile hücre

canlılığı ve proliferasyonu tayin edilmiştir. Ayrıca malzemenin toksik olup olmadığını değerlendirebilmek amacıyla sitotoksite analizi yapılmıştır.



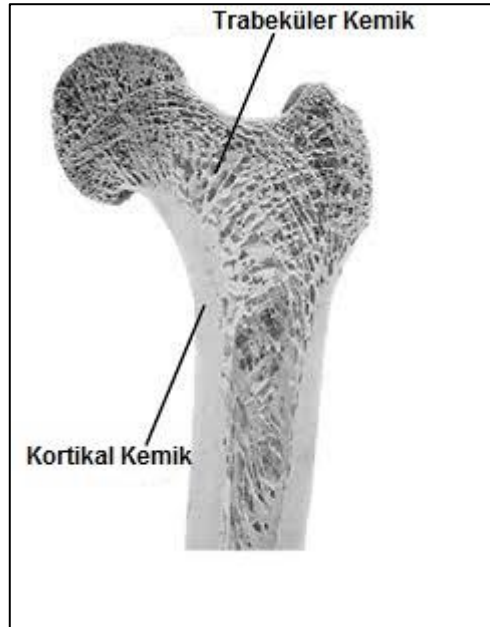
2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kemiğin Yapısı, Fonksiyonu ve Genel Özellikleri

Kemik, organizmanın en sert ve temel yapısıdır. Omurgalı canlıların iskelet sistemini oluşturur ve rejenerasyon yeteneğine sahip canlı bir doku olmakla birlikte değişen fonksiyonel ihtiyaçlara ve mekanik streslere adapte olup yapısını değiştirebilen dinamik bir dokudur. Hem doku hem de organ sistemi olarak görev yapan kemik, bağ dokusunun özel bir şeklidir. Kemik dokusu diğer bağ dokularında olduğu gibi hücreler, lifler ve temel maddeden oluşmuştur ve yapısında kalsiyum bulunması sebebiyle sertleşmiş bir yapıya sahiptir.

Kemik dokusunun karmaşık organizasyonu ve eşsiz özellikleri insan vücudunda çok sayıda benzersiz fonksiyon gerçekleştirmesini sağlar. Kemiğin temel görevleri; iç organları korumak, vücuda destek sağlamak, kemik iliği aracılığıyla kan hücrelerini üretmek, kandaki asit ve baz dengesini ayarlamak, kanda bulunan ağır metalleri uzaklaştırmak, kalsiyum ve fosfor depolamaktır.

Kemik morfolojik olarak; kortikal (kompakt) ve trabeküler (süngerimsi) kemik olarak karakterize edilir. Bu iki bölgenin kemik içindeki yerleşimi Şekil 2.1’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Trabeküler ve kortikal kemik [1]

Fonksiyonel olarak, kansellöz kemik, kortikal kemiğe kıyasla metabolik kabiliyetlerle daha yakından ilişkiliyken, kortikal kemik genellikle daha fazla mekanik mukavemet sağlar. Kemiğin malzeme özellikleri ve tasarımı, kemiğin sertlik ve mukavemetine katkıda bulunarak kırılmadan fizyolojik yüklere dayanma kabiliyeti verir. Kemiğin sert fakat kırılğan olmayan bir yapıda olmasının sebebi sert mineral ve esnek kollajen yapının bir arada olmasından kaynaklanmaktadır.

Tipik olarak yetişkin iskeletinde %80 kortikal kemik ve %20 trabeküler kemik bulunur. Kortikal kemik esas olarak mekanik ve koruyucu bir fonksiyon üstlenirken, trabeküler kemik ise metabolik fonksiyonlardan sorumludur. Trabeküler ve kortikal kemik iskeletin farklı yerlerinde değişik oranlarda bulunurlar.

Kortikal veya kompakt kemik, başlıca appendiküler (ekstremiteler, skapula, klavikula, pelvis) iskelet sisteminde bulunur. Kortikal kemik yaklaşık %10-30 arasında gözeneklilikte olup, pürüzsüz, sıkı ve beyaz bir dış tabakaya sahiptir. Kortikal kemiğin yapısal birimi, lamel adı verilen yoğun kemik katmanlarından oluşan silindirik şeklindeki osteonlardır. Osteonlar kemiğin uzun eksenine boyunca uzanır ve volkmann kanalları ile birbirine bağlanırlar. Osteonların merkezinde, sinir ve kan damarlarını içeren 'Havers kanalı' bulunur ve bu kanalın çevresi kortikal kemik veya lamella ile sarılmıştır. Lamella'lar, lakuna olarak adlandırılan boşluklar içerisinde bulunan kemik hücrelerini barındırır. Lakuna ve Havers kanalları arasındaki bağlantı ise 'kanalikuli' olarak adlandırılan küçük kanallar aracılığıyla sağlanır. Kortikal kemikteki hücre döngüsü yavaştır ve osteoblast ve osteoklastların aktif olduğu osteonun uç kısmında meydana gelir [2].

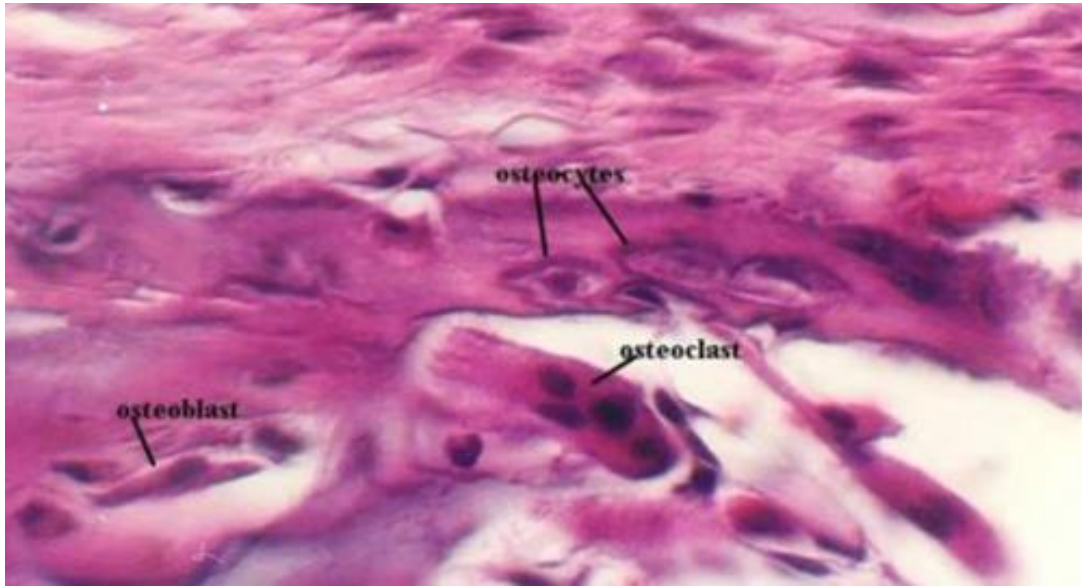
Trabeküler kemik ise, kemiğin ağırlıkça %20'sini oluşturur. Süngerimsi ve gözenekli yapıda olan trabeküler kemik; kaburgalarda, omurgada ve uzun kemiklerin uçlarında bulunur. Trabeküler kemik trabekül adı verilen bir seri birbirine bağlı kemik plakasından oluşmaktadır. Her kemik trabekülleri kollajen fibril içermektedir ve trabekülde bulunan kemik lamelleri birbirine paraleldir. Kemik hücreleri ise bu kemik lamellerinin üzerinde bulunmaktadır. Trabeküler kemik yaklaşık %50- 90 gözenekliliğe sahiptir. Bu gözeneklerin içi kırmızı kemik iliğiyle doludur. Kemik hücreleri besinlerini kemik iliğindeki damarlardan temin etmektedirler. Ayrıca trabeküler kemiğin gözenekli yapısı kemiğin metabolik aktiviteler için yüzey alanını arttırırken mekanik dayanımı da sağlamaktadır. Trabeküler kemik plakalar halinde birbiri ile bağlantılı olduğu için kemiğe yansıyan çeşitli basınç yüklerine karşı kemiğin dayanma gücünü arttırması nedeniyle önemlidir. Trabeküler kemikte damar, kas ve sinir bulunmaz.

2.1.1 Kemik Hücreleri

Kemiğin inorganik-organik kompozit yapısında yaşayan üç hücre tipi vardır. Bunlar; osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır.

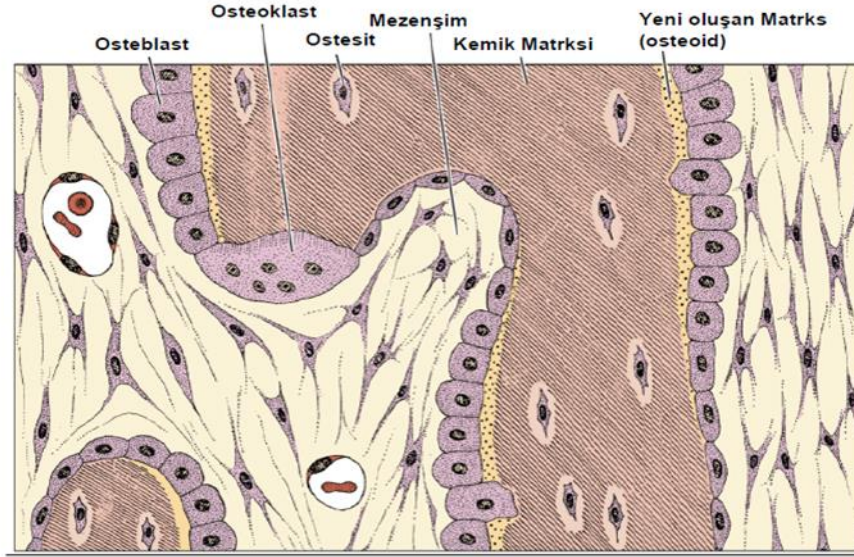
Osteoblastlar, kemik oluşumundan sorumludurlar ve metabolik aktiviteleri yüksek olan hücrelerdir (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3) [3]. Osteoblastlar genel olarak endoplazmik retikulum ile çevrelenmiş çekirdeğe sahiptirler [4]. Yüksek oranda alkalen fosfataz aktivitesi gösterirler. Bu da kemik matriksinde kalsiyum depolanmasını osteoblastların düzenlediğinin göstergesidir. Osteoblastlar bölünme özelliği olmayan, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşması sonucu oluşan hücrelerdir. Osteoblastlar kollajen fibrilleri, proteoglikanları, glikozaminoglikanı, glikoproteinleri salgırlar ve osteoklast aktivitesini düzenlerler. Osteoblastların aktiviteleri yeni kemik oluşumunun durmasıyla yavaşlar ve daha sonra da tamamen durur. İğ şeklinde hücelere dönüşerek osteoit yapısına geçerler [3].

Osteositler, lakünalar içinde matrikste bulunan olgun hücrelerdir (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3). Osteositler, tamamen olgunlaşmış kemik hücreleridir ve gelişimleri tamamlanmış olduğu için sentez yapamazlar. Osteositler diğer kemik hücelerine dönüşebilme özelliğine sahiptir. Örneğin, kemik yıkımı sırasında içinde bulundukları lakünlerden çıkıp dinlenme halindeki osteoprogenitor hücelere, bu osteoprogenitor hücelere de osteoblastlara dönüşebilmektedir. Osteositler kemik ve kan arasındaki kalsiyum ve fosfat derişimini düzenleme gibi metabolik olaylarda da görev alırlar [5].



Şekil 2.2 Kemik Hüceleri (<http://www.baileybio.com>)

Osteoklastlar, hematopoetik kök hücrelerden köken alan çok çekirdekli hücrelerdir. Temel fonksiyonu mineral fazı çözmek ve organik kemik matriksini rezorbe etmektir. Ayrıca yabancı maddelerin yıkımında da görev alırlar. Çok sayıda nükleusa sahiptirler ve sitoplazmalarında bol lizozom bulunur. Kemik yıkımı için kullanılan kolagenaz ve hidrolitik enzimleri salgırlar [6].



Şekil 2.3 Olgun bir kemikteki çeşitli kemik hücreleri (Junqueira, 2005)

2.1.2 Kemik Matriksi

Kemik matriksi organik ve inorganik olmak üzere iki ana fazdan oluşmaktadır. Organik faz genel olarak proteinlerden oluşurken, inorganik faz tuzlardan oluşur ve organik faz içerisinde dağılmış bir yapıdadır. İnsan femur kemiği matriksi, %70 inorganik tuzlar, %20 organik faz ve %10 sudan oluşmaktadır.

Kemik organik fazınının temel yapısal birimini büyük miktarda Tip I kollajen oluşturur. Bu kollajen moleküllerinin bir araya gelmesiyle kollajen fibriller, kollajen fibrillerin bir araya gelmesiyle kollajen fiberler ve kollajen fiberlerin bir araya gelmesiyle ise kemik lamellası oluşur. Kemiklerin yapılarının çok sert olmasına karşın kolay kırılmamasının sebebi yapısında bulunan kollajen fibrillerdir. Bu yapılar kemik yapısında bulunan hidroksiapatit kristallerinin birikimi için bir çerçeve görevi görürler. Hidroksiapatit kristalleri bu yapılar üzerinde çubukçuklar ya da küçük tabakalar oluşturarak birikirler. Kemiğin güçlü, kırılmaya

dayanıklı sağlam, yerine göre esnek bir doku olmasının sebebi yapısındaki protein-kristal birleşimidir [3,7].

Organik fazın geri kalan kısmını ise kemik hücrelerinin fonksiyonlarını yöneterek, kemik sentezini ve yıkımını düzenleyen proteinler oluşturur. Bu proteinler; osteonektin (ON), osteopontin (OPN), osteokalsin (OCN) gibi kemik indükleyici proteinler, kemik siaoloprotein (BSP), kemik proteoglikanları, proteolipidler gibi non-kollajen proteinlerdir.

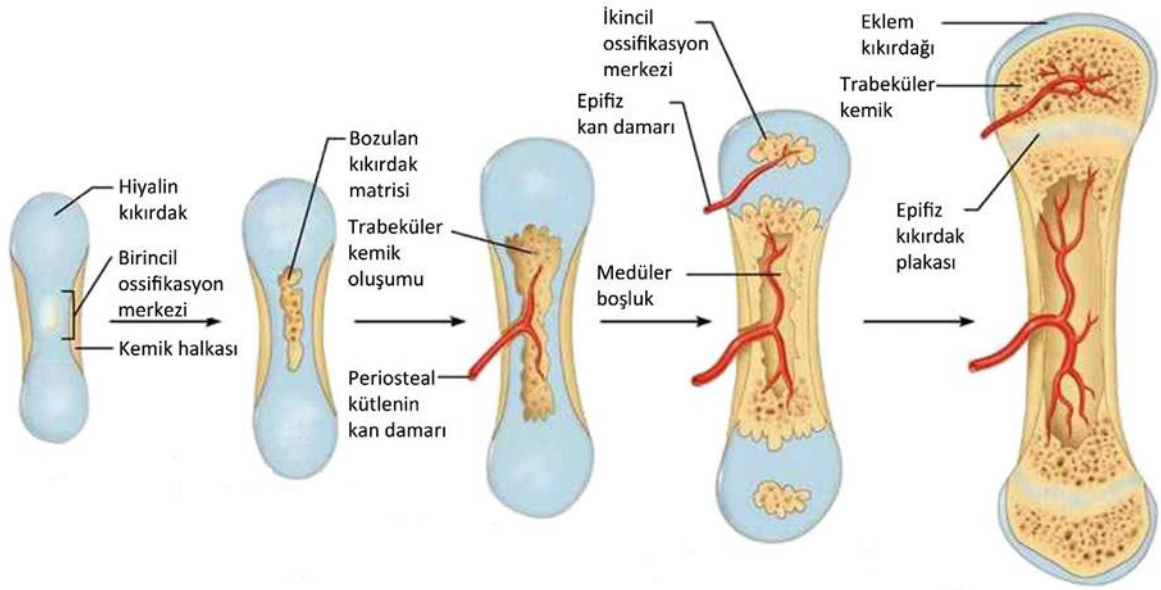
Kemiğin inorganik fazınının büyük bir kısmını kimyasal formülü, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ olan, yarı kristalin formdaki hidroksiapatit (HA) oluşturur. Bu kristallerin kemik matrisi içerisinde düzenli bir şekilde dağılması ile kemiğin sağlamlığı sağlanır. Kemiğin olgunlaşması yapısında bulunan HA kristallerinin büyüklüğü ile ilgilidir. Yapısında küçük HA kristalleri bulunan bir kemik matriksi yeni oluşan bir kemik matriksidir [8,9].

2.2 Kemik Oluşumu ve Resorpsiyonu

İnsan vücudunda kemik dokusu, endokondral ve intramembranöz (mezenkimal) olmak üzere iki şekilde oluşur. Endokondral kemikleşmede kıkırdak doku etkinken, intramembranöz kemikleşmede bağ dokusu etkindir. Her iki kemikleşmede de ilk oluşan kemik primer kemik yani olgunlaşmamış kemiktir. Primer kemik kalıcı olmayıp yerini olgun lamelli kemik dokuya bırakmaktadır.

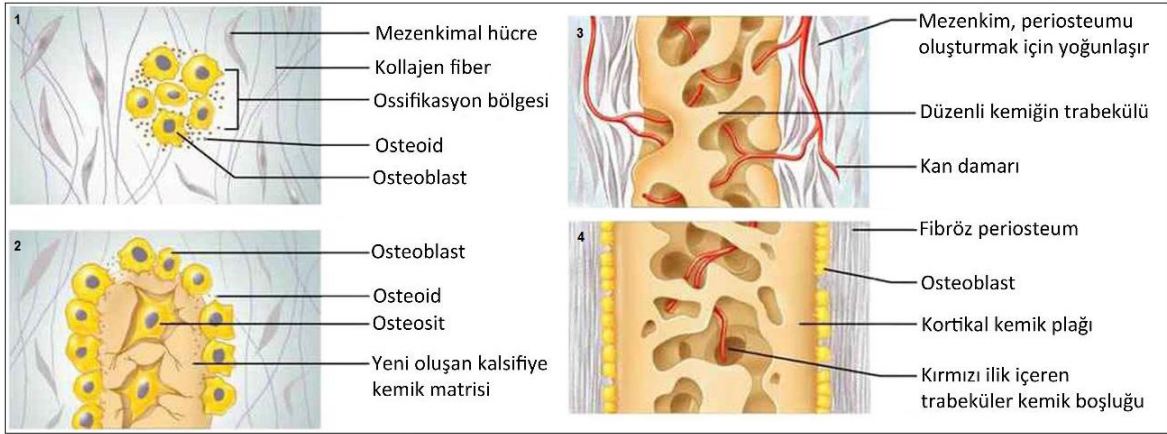
Kemik yapımı, yıkımı ile senkronize bir şekildedir. Kemik dokusu devamlı yenilenen aktif bir yapıdır ve kemik dokusunun yenilenmesi kimyasal ve mekanik koşullar ile ilişkilidir.

Endokondral kemikleşme hiyalin kıkırdağın yerini kemik dokuya bırakmasıdır. Özellikle uzun kemiklerin şekillenmesi endokondral kemikleşme ile gerçekleşir. İlk olarak, osteoblastlar osteoidleri sentezleyerek hiyalin kıkırdak yapısındaki diyafizin çevresinde kemik halkası oluşturur. Diyafizin merkezinde bulunan kıkırdak kalsifiye olur ve yapısı bozularak boşluklar oluşturur. İç boşlukların periosteol kütle ile dolması sonucu trabeküler kemik oluşur. Ossifikasyon devam ederken medüler boşluk oluşur ve epifizde ikincil ossifikasyon merkezi oluşur. İkincil ossifikasyon bölgelerinin gelişmesiyle epifiz kemikleşir. Ossifikasyon tamamlandığında hiyalin kıkırdak sadece epifiz plakasında ve eklem kıkırdağında kalır.



Şekil 2.4 Endokondral kemikleşme (Junqueira, 2005)

İntramembranöz kemik oluşumu ise genel olarak kafatası gibi yassı kemiklerin veya kısa kemiklerin yapımında etkindir (Şekil 2.5). İntramembranöz kemikleşmede geçici kıkırdak yapısı olmaz ve mezenkimal hücre organizasyonu ile kemik gelişimi gerçekleşir. Mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşarak ossifikasyon merkezini oluşturur. Osteoblastlar birkaç gün içerisinde mineralleşen osteoid sentezlemeye başlar ve matris içerisine hapsolmuş osteoblastlar osteositlere dönüşür. Eş zamanlı gelişen birçok kemikleşme merkezinin biraraya gelip kaynaşması sonucu trabeküler yapı oluşur. Damarlanmış mezenkimal düzenli kemiğin dış yüzeyinde yoğunlaşır ve periosteum halini alır. Trabekül, periosteuma yaklaşarak kalınlaşır ve daha sonra olgun lamellar kemikle yer değiştiren düzenli kemiği oluşturur. Trabeküler kemik, yapı içerisine doğru yerleşir ve damarlı dokusu kırmızı iliğe dönüşür [10].



Şekil 2.5 İntramembranöz kemikleşme (Junqueira, 2005)

2.3 Kemik Rejenerasyonu

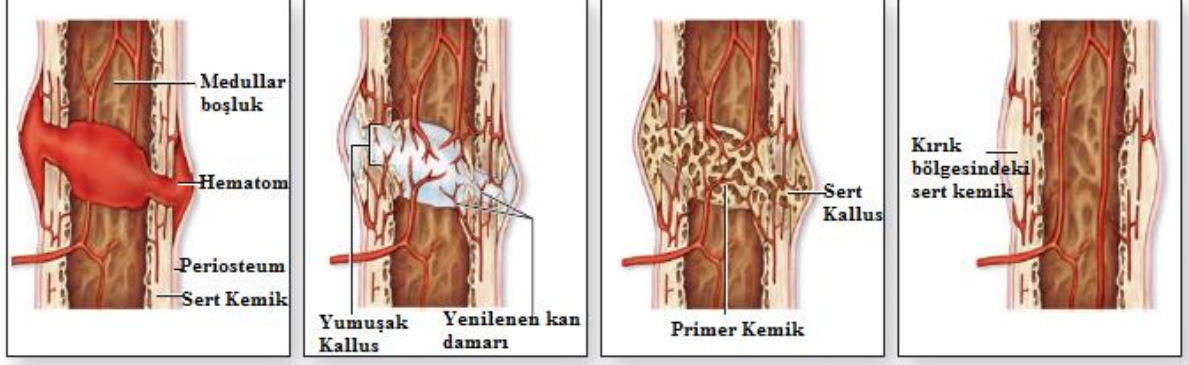
Vücutta herhangi bir nedenle hasar gören dokular belirli bir ölçüde rejenere olma özelliğine sahiptirler. Kemik doku da kendini onarıp yıkma özelliklerine sahip olan bir dokudur. Kemiğin kendini yeniden şekillendirmesi yapısında bir değişim olmaksızın mineralize kemiğin değişimidir.

Kemikte kırık meydana geldiğinde, kırık bölgesinde yeni bir kemik dokusu oluşur ve kırık bölgesi normal işlevini geri kazanır.

Kırık, kemik dokudaki kan damarlarına hasar verir, kırık bölgesinde kanama oluşur ve kan pıhtılaşır. Nötrofiller ve makrofajlar ortama gelerek hasarlı dokuyu ortadan kaldırırlar. Kırık bölgesinde damarların ve fibroblastların arttığı gözlenir. Bu bölge fibröz bir doku yapısı haline gelir ve kırık bölgesi kıkırdak dokuya dönüşür. Oluşan bu dokuya kemik kallusu denir. Bu sırada kırık bölgesinde bulunan periosteuma ve endosteuma ait osteoblastlar çoğalarak kırık bölgesine gelerek bu bölgede bir hücre katı oluştururlar. Bu bölgede endokondral kemikleşmeye benzer şekilde primer kemik oluşur. Ayrıca intramembranöz kemikleşme de olur. Onarım esnasında ilk olarak henüz olgunlaşmamış bir doku olan primer kemik dokusu gelişmektedir. Primer kemik dokusu daha sonra giderek ortadan kaybolarak yerini esas kemik dokuya bırakır. Böylece onarılmış kemik kırık bölgesinde tamamen eski şekline kavuşur ve görevlerini yerine getirebilecek duruma gelir.

Kemik rejenerasyonundaki en önemli iki faktör kırık bölgesinin mekanik dayanıklılığı ve damarlanmasıdır. Kemik rejenerasyonu, şiddetli kırıklarda tam bir yıl sürebileceği halde, kemiği orijinal kırılma öncesi kuvvetine geri döndürür. Bununla birlikte, eğer vücudun

kemik hasarına tepkisi yeterince aktif hücreler sağlamıyorsa veya bir kusur vücudun doğal iyileşme tepkisi için çok büyük olduğunda, kırık bölgesinde birleşmeme meydana gelir [11].



Şekil 2.6 Kemik rejenerasyonu (Junqueira, 2005)

2.4 Doku Mühendisliği

Organ ve dokuların hastalara nakledilmek üzere laboratuvar koşullarında oluşturulması üzerine çalışılan bir bilim dalı olan doku mühendisliği, canlı hücreler ve biyobozunur, biyouyumlu polimerik doku desteklerinden ve canlı hücrelerden doku ve organların geliştirilmesini konu alır [12].

Doku mühendisliği spinal füzyon, eklem replasmanı, kırıkların kaynamaması ve kemiklerin patolojik kaybı gibi sayısız klinik durumun iyileştirilmesi için uygulanabilen gelişmekte olan bir alandır [13].

Doku mühendisliği, organ naklinde karşılaşılan donör azlığı, immün cevap oluşumu gibi sebeplerden dolayı yaşanan sorunlara bir çözüm üretmek amacıyla ortaya konan multidisipliner bir alandır.

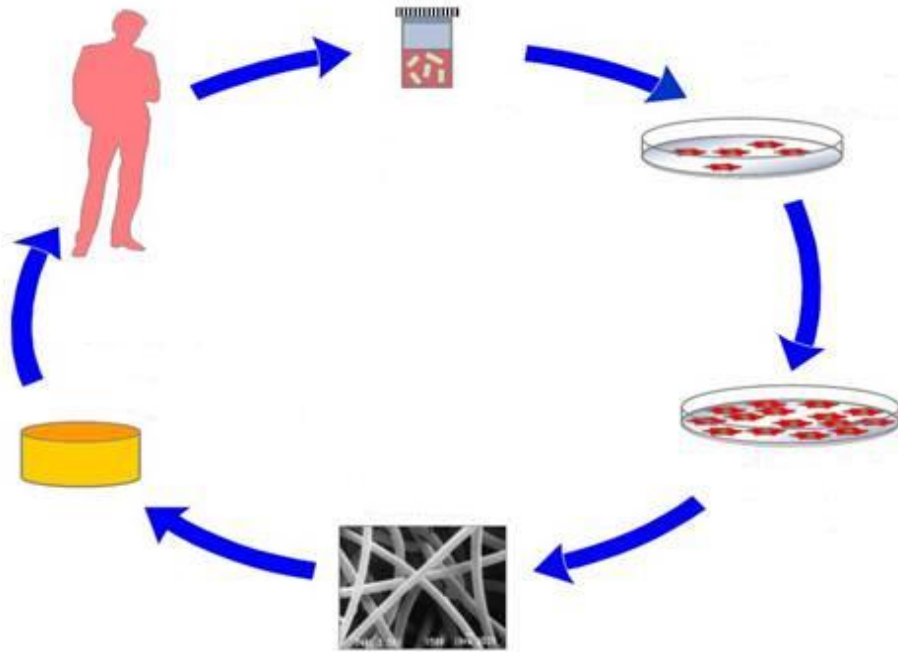
Doku mühendisliğimin tanımı ilk defa 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından yayınlanan bir makale ile yapılmıştır. Langer ve Vacanti'ye göre doku mühendisliği; hasarlı veya kaybedilmiş dokuların fonksiyonlarını karşılayan, sürdürülebilir kılan ve yeniden modellemeyi hedef alan multidisipliner bir alandır.

Doku mühendisliği ile ilgili ileri sürülen 3 temel unsur bulunmaktadır. Bu temel unsurlar;

- 1- Doku iskelesine ekilecek hücrelerin çalışmanın amacına uygun seçilmesi
- 2- Büyüme faktörleri, sitokinler gibi biyosinyal moleküllerinin doku uyarıcı olarak kullanılması
- 3- Doku iskelelerinin üç boyutlu kültür ortamını sağlaması

Şekil 2.7' de doku mühendisliğinin temel prensibi gösterilmektedir.

Hastadan veya başka bir kaynaktan alınan hücreler bir doku iskelesi üstüne ekilirler. Bu doku iskelesine bağlanıp göç ederler ve ardından farklılaşıp çoğalabilirler. Doku iskelesi, hücreler için üç boyutlu destek materyali olarak işlev görerek, hücrelerin kendi mikroçevrelerini oluşturmalarını sağlar. Daha sonra bu doku iskeleleri hasarlı dokuların yerine vücuda yerleştirilir ve böylece doğal dokunun rejenere olma süreci başlar. Bu esnada kan damarları iskele içine nüfus eder ve doku iskelesi bozunurken yerine oluşacak yeni dokunun oluşmasına öncülük eder. Süreç tamamlandığında cerrahi işleme gerek kalmadan vücut tarafından absorbe edilirler [14].



Şekil 2.7 Doku mühendisliğinin temel prensibi

Tasarlanan doku iskelesinin biyouyumlu ve biyobozunur olması, açık gözenekler içeren gözenekli yapıya sahip olması gerekmektedir. En önemli parametrelerden biri olan damarlanma, bu alanda halen aşılması gereken önemli bir sorun olarak devam etmektedir. Bu amaçla, tasarlanacak olan doku iskelelerine büyüme faktörü ilave edilmektedir.

Teknolojinin gelişmesine bağlı olarak, doku mühendisliği ürünleri klinikte geniş bir yer bulacaktır. Doku ve organ yenilenmesi için, hasarlı organ veya dokuyla yer değiştirebilecek özellikte tasarlanan doku mühendisliği ürünlerinin bir kısmı araştırma ve bir kısmı klinik kullanım olmak üzere günümüzde önemli bir yere sahiptir. Bu alanda yapılan çalışmalar biyomalzeme ve kök hücre teknolojisi alanındaki gelişmelerle birlikte önemli bir hız kazanmıştır.

2.5 Kemik Doku Mühendisliği ve Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Vücudun yük taşıyan bölgeleri olarak kemik doku hasarları veya kayıpları yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir.

Kemik onarımı ve yenilenmesi için sunduğu yenilikçi yaklaşımlarla kemik doku mühendisliği, giderek gelişen bir çalışma alanıdır. Kemik doku mühendisliğinde amaç, kemiğin doğal yapısını ve yenilenme sürecini başarılı bir şekilde taklit ederek ikincil operasyonlara gerek kalmadan ve immün cevap geliştirmeden canlı ve işlevsel yapay kemik dokusunu geliştirmektir.

Kemik doku mühendisliğinde, polimerik doku iskeleleri, canlı hücreler ve indüktif ajanlar birlikte kullanılır. Bir önceki bölümde bahsedilen doku mühendisliğinin stratejileri uygulanır. Doku iskelesinin yerleştirilmesini takiben doğal kemik gözenekli iskele içerisine doğru büyüyüp geliştikçe ve hücreler kendi hücre dışı matrislerini oluşturdukça biyobozunur yapıdaki iskele bozunurarak doğal kemik ile yer değiştirir.

Doku mühendisliği yaklaşımıyla yapay kemik dokusu oluşturulmasında hücre taşıyıcısı ve doku desteği olarak kullanılacak yapıların hazırlanması için seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler kullanılmaktadır. Bu malzemeler biyouyumlu ve biyobozunur olmalı ve bozunma ürünleri sitotoksik olmamalıdır. Bunların yanı sıra, dokunun iyileşme hızı ile doğru orantılı bozunmalıdır. Mekanik dayanıklılığı yerleştirilecek olan bölgeye uygun, kemik iyileşme sürecinde yapısal bütünlüğünü koruyan, osteokondüktif özellikte ve defekt bölgesine yapısal ve mekanik olarak tam bir uyum gösteren malzemeler kullanılmalıdır.

Ayrıca kemiğin doğal yapısını taklit edebilmeli ve damarlanmaya engel olmayacak ölçüde gözenekli olmalıdır [15,16].

Yukarıda bahsedilen özellikleri karşılayan doku iskelelerinin hazırlanmasında özellikle doğal veya sentetik biyobozunur ve biyouyumlu yapıda çok sayıda polimer kullanılmaktadır. Kollajen, aljinat, nişasta, kitosan, jelatin ve polihidroksialkanoatlar gibi doğal polimerler vücut ile biyouyumlu olmaları sebebiyle çok fazla kullanılmaktadır. Buna karşın doku iskelesi hazırlanmasında, hazırlanması ve temin edilmesi daha kolay olan ve düşük maliyet ile üretilibilmeleri sebebiyle sentetik polimerler de sıklıkla tercih edilmektedirler. Bunlara örnek olarak; poliglaktik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi poli(α -hidroksiesterler), poli(etilen glikol) (PEG) veya poliüretan gibi polimerler verilebilir. Literatürde sentetik ve doğal polimerlerden elde edilen matrisler üzerinde kemik hücrelerinin çoğalma ve farklılaşması ile ilgili çok sayıda çalışma vardır [17, 18,19].

Doku iskelelerin tasarımında önem taşıyan faktörler arasında gözeneklilik, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon ile kemik büyümesini indüklemeye, hedef bölge ile şekilsel olarak uyumlu olma, biyobozunur olma ve yeterli mekanik dayanıma sahip olma sayılabilir. Ayrıca doku iskelelerini şekilsel, yapısal ve mekanik özelliklerini kontrol edebilmek hedef doku ile uyumlu olması bakımından oldukça önemlidir.

Kemik doku mühendisliğinde hücre taşıyıcısı olarak en fazla incelenen yapılar arasında köpük yapısında malzemeler bulunmakla birlikte fiber yapıdaki hücre taşıyıcıları son zamanlarda gittikçe artan bir önem kazanmıştır. Poli(L-laktik asit) (PLLA) gibi sentetik polimerlerden elde edilen köpük yapıları osteoblast hücreleri ile yapay kemik dokusu üretiminde başarılı sonuçlar vermiştir [20]. Öte yandan, fiber yapılar üzerinde insan hücrelerinin tutunma, büyüme ve farklılaşmalarının daha düzgün olduğu gözlenmiştir [21].

Kemik doku mühendisliğinde, hücre kaynağı olarak kök hücreler veya primer hücrelerin kullanılmasının yanı sıra, osteosarkom hücreleri veya hücre hatları da kullanılabilir. Yüksek çoğalma ve farklılaşma kabiliyetleri sebebiyle osteoprogenitör hücreler veya mezenkimal kök hücreler kullanılmaktadır [22,23]. Bu hücreler kemik iliği, damar duvarı, periferik ve menstrual kan, fetal ve maternal plasenta, periost ve trabeküler kemik gibi çok farklı kaynaktan izole edilerek elde edilirler [24].

Kemik doku mühendisliğinde önemli bir diğer eleman olan büyüme faktörleri hücre içeren doku iskelelerinin fonksiyonelliğinin kontrolü açısından önemlidir. *In vivo* ortamda hücre

davranışlarını regüle eden büyüme faktörlerinin doku iskelelerine eklenmesi sonucu kemik iyileşmesinin arttığı, kontrollü hücre çoğalması gerçekleştiği ve damarlanmanın tetiklendiği görülmüştür [25].

Kemik doğal gelişme ve kırık iyileşmesi sürecinde kemik morfojenik protein (BMP)'ler, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleri birlikte etki göstererek süreci yönetmektedirler. Bunlar içinde, BMP moleküllerinin mezenkimal kök hücrelerin osteoblastik hücrelere farklılaşmasını tetikleyerek kemikleşme sağladığı ve bu grup içindeki en etkili ajanların BMP-2 ve BMP-7 olduğu belirtilmiştir [26].

Özetle söyleyecek olursak kemik doku mühendisliğinin amacı kemik iyileşmesi için bir cevap oluşturabilmektir. Kemiğin yeniden şekillenme sonucu çevresindeki dokular ile yapısal integrasyonu ve oluşan kemiğin görevini yerine getirebilmek için yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olması ise kemik doku mühendisliği çalışmalarının başarıya ulaştığının göstergesidir.

Kemik cerrahisinde ve ortopedide kemik doku mühendisliği çalışmaları ürünü biyomalzemeler sıklıkla kullanılmaktadır. Kemik tedavisine ihtiyaç duyan hasta sayısına bağlı olarak kemik tedavilerinde kullanılan biyomalzemelerin geliştirilmesine olan gereksinim gün geçtikçe artmaktadır.

Başlıca kemik tedavi malzemeleri; otogreft kemik, allogreft kemik ve yapay sentezlenmiş malzemeler olarak gruplandırılabilirler [27]. Otogreft kemikler, kemik tedavileri için ideal özelliklere sahiptirler fakat elde edildikleri kaynakların sınırlı olması ve ikincil ameliyatları gerektirmeleri sebebiyle çok fazla kullanılamamaktadırlar. Bu sebeple kolay tasarlanmaları ve fazla bulunmaları sebebiyle sentetik kemik tedavi malzemeleri sıklıkla tercih edilmektedirler.

Kemik tedavi malzemeleri için bir diğer gruplandırma bu malzemelerin bozunma performanslarına göre yapılabilir. Buna göre kemik tedavi malzemeleri, biyoinert ve biyobozunur malzemeler olarak iki gruba ayrılır. Biyoinert implantlar kemik fiksasyonu için başarılı sonuçlar vermesine rağmen bazı problemleri de beraberinde getirir. Bunlardan bazıları, insan vücudunda fonksiyonel bir bozukluğa sebep olmazsa sonsuza kadar vücutta kalmaları veya ikinci ameliyatı gerektirmeleridir.

İkincil ameliyatların hem maliyetli olmaları hem de hastaların acı yüklerini arttırmaları sebebiyle günümüzde kendine özgü bozunma karakteristikleri olan biyobozunur malzemelere ilgi artmıştır [28].

Kemik kırık tedavilerinde kullanılan biyomalzemeler için bir diğer sınıflandırma ise kırıkların tespiti ve fiksasyonu için kullanılan malzemelere göre yapılabilir. Buna göre bu biyomalzemeler implantlar, kemik çimentoları ve kemik yapıştırıcıları olarak gruplandırılabilir. Bu bölümün devamında bu tez çalışması kapsamına bağlı olarak kemik yapıştırıcıları ve kemik çimentoları ile ilgili genel bilgiler verilmiştir.

2.5.1 Kemik Yapıştırıcıları

Günümüzde sağlık alanında kemik kırıklarının stabilize edilmesi için alçı kullanılması, harici stabilizasyon, plakalar ve vidaların kullanılması gibi yöntemler vardır. Ancak bu yöntemler tüm kemik kırık tipleri için uygun değildir. Kırıkların düzensiz bir yüzeyde, ince kemikte, parçalanmış kemikte veya hassas dokulara yakın olduğu durumlarda kemik yapıştırıcıları alternatif bir çözüm olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kemik kırıklarının iyileşmesi yaşa, kırılan kemiğin türüne ve kırığın derecesine göre yaklaşık 12 hafta sürer. Kemik onarımı sırasında iyileşme sürecini kolaylaştırmak, kemiğin düzgün şekilde iyileşmesini sağlamak, şekil bozukluklarını ve gereksiz yere ağrıyı önlemek için genellikle kemik kırıklarını mekanik olarak desteklemek gerekmektedir. Bugün tıpta, kemik stabilizasyonu için birkaç farklı yöntem vardır. Orijinal konumlarına yerleştirilmesi kolay ve komplike olmayan kırıklar için alçı kullanılırken, daha karmaşık kırıklar için vidalar ve metal plakalar ile stabilizasyon sağlanır. Bu implantlar genelde iyi sonuçlar vermesine rağmen ince kemik, düzensiz yüzeyler, parçalanmış kemik veya hassas doku yakınındaki kırıklar için uygun değildir. İmplantın yerleştirilmesi için yapılacak olan ince kemikte delme işlemi, yeni kırıklara ve hassas dokulara neden olabilir ve dokuya zarar vermek için büyük bir risk söz konusudur. Düzensiz yüzeyli kırıklarda ise kemiğe iyi uyan bir plak bulmak zor olabilir. Bunlara ek olarak, her kırığa her zaman açık cerrahi ile ulaşmak mümkün değildir ve bu nedenle implant stabilizasyonu bazen zor olabilir. Bu bağlamda, kemik yapıştırıcıları kemik kusurlarının tedavisinde cazip alternatiflerdir.

Kemik yapıştırıcıları, uygulanabilir olması için birçok özellik gerektirir. Öncelikle nemli veya ıslak cerrahi koşullar altında bile kemiğe verimli bir şekilde bağlanmalıdır. İkincisi, bir yapışkan olarak güçlü bir mekanik yapıya sahip olmalı diğer bir deyişle yapıştırma mukavemeti yüksek olmalıdır. Yapıştırıcının mekanik özelliklerinin güçlü olması

yapıştırılacak malzeme ile yapıştırıcı arasında bulunan adezyon ve kohezyon kuvvetlerine bağlıdır. İyi bir yapıştırıcı bu adezyon ve kohezyon kuvvetleri ve birleştirilecek malzemenin iç bileşimi kadar güçlüdür.

Üçüncü olarak, sert bir canlı ortamda birkaç ay sonra bile yüksek mekanik özellikler sergilemelidir. Bir diğer önemli parametre ise bu yapıştırıcıların vücutla biyouyumlu olması gerektiğidir. Dolayısı ile kemik yapıştırıcısı olarak kullanılacak malzemenin tüm bu özellikleri bir arada bulundurması gerekmektedir. Bu nedenle, tüm bu özellikleri birarada bulunduran ve kemik kırıklarının tedavisinde kullanılan bir kemik yapıştırıcısı bulunmamaktadır [29].

Travma ve ortopedik cerrahide klinik uygulamaya yönelik tıbbi bir kemik yapıştırıcısının sahip olması gereken özellikler Çizelge 2.1’ de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 Tıbbi Kemik Yapıştırıcısı için Gereklilikler

Biyouyumluluk	• Önceden saptanmış bir sürede biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak emilebilir olmalı • Toksik, kanserojen ve teratojenik olmamalı • Doku tahrişi veya doku nekrozuna sebep olmamalı • Polimerizasyon sırasında minimum ısı gelişimine sahip olmalı
Yapışma/bileşik dayanımı	• Kırık bölgesinde yüksek bağlanma mukavemetine sahip olmalı • Çekme mukavemetine, kayma kuvvetine ve sıkışma mukavemetine dayanıklılık sağlamak için yeterli elastikiyete sahip olmalı • Nemli yüzeylere yapışabilir olmalı
Uygulama	• Kolay hazırlanabilmeli, tek viskoziteli macun veya süspansiyon olarak uygulanabilir yapıda olmalı
Diğer Özellikler	• Hızlı kür olmalı (1-10 dk ayarlanabilir süre) • Saklama süresi boyunca kararlı yapıda olmalı • Sterile edilebilir olmalı • Ekonomik olarak uygun olmalı

Biyolojik materyalleri kullanarak kemikleri yapıştırma fikri, bir yüzyıldan fazla bir süre önce Gluck tarafından Berlin'de önerilmiştir. Gluck yumuşak dokuyu tavuk kan türevleriyle, kemik dokusunu 'litokolle' ile bağlamıştır ve kolofan, pomza ve alçıdan oluşan kemik tutkalının kullanımı hakkında bilgi vermiştir.

İlk kemik yapıştırıcısı ise 1931'de Hedri tarafından tanımlanmıştır. Kolajen ve fibröz protein içeren karışımını "ossocol" olarak isimlendirmiştir. Başlangıçtaki iyi bağlanma kuvveti ve kırık iyileşmesi gözlenmiştir, ancak ciddi alerjik reaksiyonlara sebep olması nedeniyle kullanımı engellenmiştir [31, 32].

Bugüne kadar bu alandaki araştırmaların uzun zamandır devam eden geçmişi, kemik yapıştırma alanında klinik olarak geçerli bir alternatif bulamamıştır. Canlı organizmanın koşullarına uymaması sebebiyle bu yapıştırıcıların uygulamaları sürekli başarısızlığa uğramıştır.

Çizelge 2.2 Kemik yapıştırıcılarının sentetik, biyolojik, güncel gelişmelerdeki sınıflandırılması

Sentetik Kemik Yapıştırıcıları	• Poliüretan Köpükler • Polimetilmetaakrilatlar (PMMA) • Siyanoakrilatlar • Laktit-metakrilat tabanlı sistemler
Biyolojik Kemik Yapıştırıcıları	• Fibrin Yapıştırıcılar (jelatin-rezorsin-aldehitler) (protein-aldehit sistemler) • Midye yapışkan proteinler ve mimetik polimerler • " Sandcastle tutkalı "
Günümüzdeki Gelişmeler	• Peptit Bazlı Yapıştırıcılar • Oligo- ve Polilakton Bazlı Yapıştırıcılar • Alkilen bis (oligolaktoil) - Metakrilatlar

Çizelge 2.2' de kemik yapıştırıcılarının sentetik, biyolojik ve güncel gelişmeleri olmak üzere sınıflandırmaları verilmiştir [30].

Çizelge 2.2 incelendiğinde kemik yapıştırıcılarını sentetik kemik yapıştırıcıları ve biyolojik olarak esinlenen kemik yapıştırıcıları olarak iki gruba ayırabiliriz.

Kemik için kullanılan sentetik yapışkanlar arasında; polimetilmetakrilatlar, siyanoakrilatlar, poliüretanlar, epoksi reçineler bulunmaktadır. Genel olarak bu yapıştırıcılar, özellikle kemik yapıştırıcısı olarak tasarlanmaktan ziyade diğer alanlardan veya uygulamalardan alınmıştır. Biyolojik yapışkanlara kıyasla daha yüksek yapışma mukavemetine sahip olma eğiliminde olmalarına rağmen çoğu kez göreceli olarak kötü biyouyumluluk gösterirler ve çoğu biyolojik olarak bozunabilir değildir.

2.5.1.1 Poliüretanlar

Poliüretanlar, bir kemik yapıştırıcısı geliştirmek için ilk girişimlerden birini temsil eder. "Ostamer", 1950'lerde geliştirilen, yerinde sertleşen, biyolojik olarak parçalanabilen bir poliüretan köpüktür ve klinik olarak deneylerde kullanılmıştır. Maalesef, bu ilk deneylerden çıkan sonuçlar olumlu değildir ve polimer kırılması, kemiğe bağlanmasının zayıf olması, yüksek enfeksiyon oranları ve yabancı cisim reaksiyonları gibi başlıca komplikasyonlar geliştiği gözlenmiştir. Bu nedenle, poliüretanların geliştirilmesi, uzun yıllar aktif olarak ilerlememiştir [27]. 1990'lı yıllarda, biyoadheziv poliüretan sistemlerinde, nispeten düşük yük taşıyıcı durumda da olsa, başarılı bir *in vivo* deneme dahil olmak üzere daha fazla çalışma rapor edilmiştir [28,29]. Kısa süre önce Kryptonite™ ticari isimli ürün FDA onayı almıştır. Bu ürün, intraoperatif olarak karıştırılabilen hint yağına dayanan polioller, reaktif bir izosiyanat ve kalsiyum karbonat dolgusunu içermektedir. İlk başlarda bir kemik dolgu maddesi olarak geliştirilmiştir ancak kemik yapıştırıcı olarak kullanımı önerilmiştir ve klinik olarak sternal kapatmada kullanılmaktadır [30].

Çalışmalarda hekzametilen diizosiyanat (HDI) türevi parçalanmış poliüretan elastomerlerden sentezlenen iskelelerin, bir ovin (küçükbaş) iliak krest defekt modelinde kemik iyileşmesini desteklediği bildirilmiştir. HDI-türevli parçalanmış poliüretan elastomerlerden % 90'a kadar gözenekliliğe sahip gözenekli iskeleler imal edilmiştir. İskelenin *in vitro* kalsifikasyonu, makrodolün artan hidrofilitesi ile artmıştır. 6 ay boyunca ovine iliak krest defektlerine implante edildiğinde, iskeleler sağlıklı süngerimsi kemiğe benzer bir kalsiyum-fosfor oranına sahip olup yeni kemik oluşumunu desteklemiştir [31,32].

Poliüretanlar ayrıca biyolojik ortamda bozunabilen kimyasal bağlantılara sahip olacak şekilde de tasarlanabilir. Farklı mekanik dayanımlara sahip olacak şekilde tasarlanabilmeleri ve biyouyumlu yapıları sebebiyle doku iskelesi tasarımı gibi medikal uygulamalar için ilgi odağı olmuştur [33]. Fakat bununla birlikte özellikle diizosiyanat bileşeninden türetilen poliüretanların bozunma ürünlerinin toksik olabilmesi poliüretanlarla ilgili önemli bir sorundur. Literatürde yer alan çalışmalarda tolüen diizosiyanat (TDI) tabanlı poliüretanların bozunma ürünlerinin toksik olduğu, heksametilen diizosiyanat (HDI) gibi alifatik izosiyanatların bozunma ürünlerinin ise toksik olmadığı gözlenmiştir [34,35].

2.5.1.2 Poli (metilmetakrilat) ve ilgili sistemler

Polimetilmetakrilatlar, total kalça ve diz protezleri gibi eklem replasmanlarını düzeltmek için uzun zamandan beri kullanılmaktadır.

Yapı bakımından hamur kıvamında bir maddedir. Bileşenler karıştırıldıktan sonra hamur kıvamında bir yapı oluşturur ve daha sonra monomerin polimerizasyonu ile sertleşir. PMMA kemik ve implant arasında bir arayüz oluşturan bir harç görevi görür ve trabeküler kemiğe iyi bir şekilde bağlanır. PMMA ayrıca internal fiksasyonun birincil aracı olarak da değerlendirilmiştir. PMMA'nın kemiğe yapışma kalitesi sıvı akrilik reçine, fosforik asitle aşındırma veya tributil boranın kullanımı ile geliştirilmiştir [35]. PMMA'nın yapıştırıcı olarak kullanımı ile ilgili çoğu çalışma, iyi fiksasyon gücü ve kırıkların yeterli derecede iyileştiğini göstermiştir. Mandibuler kırıklarda, omurga kırıklarında ve izole uzun kemik kırıklarında iyi sonuçlar bildirilirken, geç yer değiştirme ve kaynama olmaması, bunların bir kemik yapıştırıcısı olarak kullanılmasını engellemiştir [30].

2.5.1.3 Siyanoakrilatlar

Kemik ve diğer doku yapıştırıcısı uygulamaları için en yaygın şekilde çalışılan yapışkan grubu siyanoakrilatlardır. Değişik depolama koşulları ve zamanlarında çeşitli siyanoakrilatların kemiğe yapıştığı bildirilmiştir. Kortikal kemiğe ilk yapışma genellikle çok iyi ve 3-10 MPa aralığında olmuştur. Bununla birlikte, bu yapışmanın suda depolamada zamanla azaldığı gözlenmiştir ve bu durum özellikle n-bütül, izo-bütül ve izo-amilin tercih edildiği etil gibi kısa yan zincir siyanoakrilatlar için geçerlidir [39].

Bununla birlikte, siyanoakrilatların yara kapanmasında yaygın olarak kullanıldığı ve birkaç ticari ürünü bulunduğu halde ortopedik alanda hiçbir ürünü bulunmamaktadır. Bu durumun, sitotoksikite ve bu yapışkan sınıfına karşı diğer olumsuz biyolojik reaksiyonların yanı sıra zamanla adezyon kaybı olmasına da bağlı olabileceği düşünülmektedir [40].

2.5.1.4 Laktit-metakrilat tabanlı sistemler

Yukarıda bahsedilen polimetilmetakrilat sistemlerinin en büyük dezavantajlarından biri, biyobozunur olmamalarıdır. Öte yandan, polilaktid polimerler ve kopolimerler biyolojik olarak bozunabilir ortopedik fiksasyon malzemelerini yapmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [36]. Bu nedenle bir takım araştırmacı, metakrilat grubunun reaktivitesi ve *in situ* polimerize olma kabiliyeti ile polilaktitin biyouyumluluk ve biyolojik olarak bozunabilirliğini birleştirmeye çalışmıştır veya metakrilat tabanlı bu sistemler polietilen glikol (PEG) veya polipropilen glikol (PPG) (ikisi de biyolojik olarak uyumludur ancak biyolojik olarak parçalanmaz) ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi biyoseramik dolgular dahil etmişlerdir [42-45].

Heiss ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir sistemde polilaktit-metakrilat, 6 laktit birime kadar oligo- laktitler, metakriloil klorit ile reaksiyona sokularak sentezlenmiş ve işlevsel hale getirilmiştir. Daha sonra bu makromer, sırasıyla bir radikal başlatıcı ve yükseltici ile kaplanmış olan β -TCP seramik parçacıklarıyla karıştırılarak birleştirilmiş ve üç bileşenli bir sistem oluşturulmuştur. Ek olarak, viskozitesini değiştirmek için sıvı bileşene 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) eklenmiştir. Yapışkan sistemin, iyi sertleştirme zamanı özellikleri, mekanik özellikler (sığır kemiğine yapışma dahil), bozunma hızı ve düşük *in vitro* sitotoksisiteye sahip olduğu bulunmuştur. Bir *in vivo* tavşan modelinde yapılan ileri testlerde de bu yapıştırıcının iyi biyouyumluluk ve düşük sistemik toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir [46, 47].

Yukarıda bahsedilen sentetik kemik yapıştırıcılarının yanı sıra biyolojik türevli birtakım yapıştırıcılar da uzun yıllardır cerrahlar tarafından kullanılmaktadır. Bu malzemeler nispeten düşük mekanik özelliklere sahiptir ve bu nedenle genellikle yumuşak doku yapışması ve sızdırmazlığı için daha çok kullanılır.

Belki de bir kemik yapıştırıcısı seçmek veya tasarlamak için göz önüne alınması gereken ilk zorluk, ıslak bir ortamda nasıl güçlü bir bağ elde edileceğidir ve bu birçok sentetik yapışkan sistemde kesinlikle önemli bir sorundur. Bununla birlikte, birçok araştırmacı bu sorunun biyolojide defalarca çözüldüğünü fark etmiştir. Buna bariz bir örnek deniz organizmalarının sert substratlara yapışmasıdır. Biyolojik olarak türemiş veya ilham veren yapışkanların ilavesi, birçok sentetikten daha iyi biyouyumluluk gösterir ve biyolojik olarak parçalanabilir olma eğilimindedir.

2.5.1.5 Fibrin ve protein-aldehit sistemleri

Fibrin yapıştırıcıları muhtemelen en çok kullanılan yumuşak doku yapıştırıcısıdır ve hemostaz için de kullanılırlar. Kanın pıhtılaşmasından sorumlu olan fibrinojenin pıhtılaşma hareketini kullanırlar. Her ne kadar iyi biyouyumluluk ve biyolojik bozunabilirliğe sahip olsalar da, muhtemelen fibrinin yapışma mukavemetinin düşük olması nedeniyle kemik için yapışma mukavemetleri, yukarıda incelenen sentetik yapıştırıcılara kıyasla düşüktür. Örneğin, sığır süngerimsi kemiğine yapışma mukavemeti 0,005-0,017 MPa [2] ve domuz kortikal kemiğine yapışma mukavemeti ise 0,011 MPa olarak bildirilmiştir [48].

Jelatin, bağ dokularında bulunan ana yapısal protein olan kollajenden türetilir. Fibrin gibi esas olarak yumuşak doku yapışması ve sızdırmazlığı için kullanılan bir yapışkan sistem üretmek için formaldehit ve resorsinol kullanılarak çapraz bağlanabilir. Kemik yapıştırıcısı olarak klinik uygulamalarda hiç kullanılmamıştır fakat potansiyel kullanımı tartışılmıştır. Kemik yapışması *in vitro* olarak yaklaşık 0,2 MPa civarında ölçülmüş ve bu miktar fibrinojenden daha güçlüyken siyanoakrilatların ve çoğu sentetik yapıştırıcının altında kalmıştır. Benzer şekilde, aldehitlerle çapraz bağlanmış diğer doğal proteinlere dayanan ticari ürünler de vardır. Bunlardan birisi, gluteraldehit ile çapraz bağlanmış büyükbaş hayvan serum albuminidir ancak düşük bağ kuvvetleri nedeniyle kemik yapışma uygulamaları için kullanılmamıştır [46,48].

2.5.1.6 Midye yapışkan proteinler ve mimetik polimerler

Midyeler yaşlandıkları alt tabaka üzerine, nemli koşullarda ve ortam sıcaklığında çeşitli yüzeylere güçlü bağlar oluşturan midye yapışkan proteinleri (MAP) salgılanması yoluyla kendilerini güçlü bir şekilde bağlayabilirler ve bu da onları doku yapıştırıcıları olarak çekici hale getirir. Bu amaçla, MAP'ler kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ancak yapışma mekanizmalarının ayrıntıları tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, MAP'lerin yüksek seviyelerde 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) içerdiği bilinmektedir ve ancak midyeden bu doğal proteinin çıkarılması ve kullanılması konusundaki zorluklara bağlı olarak, Messersmith ve diğerleri gibi araştırmacılar, [54-59] bunun yerine bu yapının hem yapışkan hem de çapraz bağlanma özelliklerini taklit edebilecek sistemlere odaklanmışlardır. Bu amaçla, DOPA'nın PEG, Pluronic (polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilen oksit blok kopolimer) ve polimetil metakrilat, polimetakrilik asit, poli(metil metakrilat) kopolimerleri gibi sentetik polimerlere ve hidrojelere dahil edildiği taklit polimerler geliştirmişlerdir. Bu yaklaşım, doku yapıştırıcıları gibi cazip özelliklere sahip bir dizi yapışkan hidrojel malzemesinin üretilmesinde başarılı olmuştur. Bununla birlikte, bu

polimerlerin hidrojel yapısının, yumuşak doku yapıştırıcıları olarak kemik yapıştırıcılardan daha uygun olduğu belirtilmiştir [49].

2.5.1.7 " Sandcastle tutkalı "

Araştırmacıları biyolojik yapışkanlara yönlendiren bir başka deniz canlısı, protein içeren bir yapıştırıcı kullanarak kum taneleri ve deniz kabuklarını birbirine yapıştırarak koruyucu "kabuk" oluşturan bir solucan türü olan *Phragmatopoma californica*'dır.

“sandcastle tutkalı” olarak isimlendirilen bu yapışkan soğuk deniz suyunda 30 saniyeden daha az bir sürede donar ve birkaç saat boyunca sağlam bir materyal haline gelir [50]. Yapıştırıcının proteinleri ters faz yüklü polielektrolitler olup, pH, salgı bezlerinden deniz suyuna dönüştüğünde yoğunlaşır ve böylece bir "kompleks koaservat" olarak davranır. Bu durum, araştırmacıların kemiği *in vitro* olarak yaklaşık 0,1 MPa bağ kuvvetleriyle bağlayabileceği gösterilen bir mimetik kopolimer sistemi geliştirmelerine yol açmıştır. Bu umut verici erken sonuçlara rağmen bu sistem kliniğe ulaşmak için daha çok çalışmaya ihtiyaç duymaktadır.

Yukarıda bahsi geçen epoksi reçineler, akrilikler gibi sentetik yapıştırıcılar ile hızlı ve güçlü bir kemik yapışmasına izin verecek bir yapıştırıcı tasarlamak için yapılan araştırmalar, yetersiz bağlanma gücü ve yetersiz biyouyumluluk nedeniyle yararlı bulunmamıştır. Deneyler, önemli oranda farklılık gösterecek şekilde düşük mukavemetli değerler vermiştir.

Bunların dışında biyolojik olarak geliştirilen doku yapıştırıcıları, yeni kemik oluşumunu inhibe ettiği, yabancı cisim reaksiyonuna neden olduğu ve kırık iyileşmesini engelleyebileceği için kırıklarda dikkatle kullanılmalıdır.

Son yıllarda doku ve kemik yapıştırıcıları üzerine yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen başarılı bir kemik yapıştırıcı maddesinin geliştirilmesinin çok erken aşamalarında olduğu açıktır.

2.5.2 Kemik Greftleri

Kemik greftleri veya kemik yerini tutabilecek maddeler kaza, travma, kemik enfeksiyonları, konjenital bozukluk, kas-iskelet sistemi cerrahisi, revizyon artroplasti veya spinal cerrahi gibi rekonstrüktif işlemler sırasında oluşan kemik defektlerini tedavi etmek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar.

Yukarıda kemik doku mühendisliği bölümünde de anlatıldığı üzere kemik doku mühendisliğinde amaç kemik iyileşmesi için bir cevap oluşturarak kemiğin rejenere olmasını, çevresindeki dokularla yapısal bir bütünlük oluşturmalarını ve kullanılan bölgeye

uygun mekanik dayanıma sahip olmasını sağlayabilmektir. Ayrıca, geliştirilen ürün toksik olmamalı, trabeküler kemiğin mekanik özelliklerine uygun mekanik özelliğe sahip olmalı ve kolay elde edilebilir olmalıdır.

Bunların dışında kemik doku mühendisliğinde kullanılacak olan greft malzemeleri osteoindüktif veya osteokondüktif, osteogenezis ve osteointegrasyon, özelliklerden bir veya birden fazlasına sahip olmalıdır. Bu kavramlara kısaca değinecek olursak:

- *Osteointegrasyon:* Uygulama yapılan kemik ile greft arasındaki yapısal ve fonksiyonel bağlantıdır.
- *Osteokondüksiyon:* Greftin çerçeve görevi görerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleme yeteneğidir.
- *Osteoindüksiyon:* Plüripotent kök hücrelerin osteoblastik fenotipe dönüşmelerini uyartabilme yeteneğidir.
- *Osteogenezis:* Greft malzemesi içinde bulunan osteoblastik hücrelerin greftin yerleştirilmesi sonrasında hayatta kalarak yerleştirilen bölgede yeni kemik oluşturabilme yeteneğidir.

Yeni kemik dokusu oluşabilmesi için "osteojenik progenitor hücreler" ortamda bulunmalıdır.

Günümüzde kullanılan iki temel kemik grefti; otogreftler ve allogreftlerdir. Bunların dışında kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler arasında kemik yerine geçebilecek maddeler arasında doğal veya sentetik seramikler, BMP, otolog kemik iliği, demineralize kemik matriksi veya kompozit greftler bulunmaktadır [53,54]. Bu yapılar sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar bakımından aşağıda kısaca incelenmiştir.

2.5.2.1 Otogreftler

Otogreftler, osteoindüktif, osteokondüktif ve osteojenik özellikleri ile “altın standart” olarak kabul edilen en güvenilir greft malzemesidir. Otolog kemik greftleri; kanselöz otogreftler ve kortikal otogreftler olarak ikiye ayrılabilir. Bu yapıların osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif olma dereceleri farklıdır.

Kanselöz otogreftler, kemik kayıplarının doldurulması, spinal füzyon ve kırık tedavisi için kemik iyileşmesini sağlayan en etkili greft malzemesidir. Bu yapının içerisinde kemik iliği hücreleri, osteoindüktif ve osteokondüktif matriks proteinleri ve osteojenik kemik nakledilir. 1960'lı yıllarda yapılan çalışmalarda otogreft uygulandıktan sonra gelişen yeni kemik

dokusunda primitif osteojenik hücrelerin canlılıklarını koruyarak zamanla osteoblastlara dönüştüğünü gösterilmiştir [55].

Kanselöz otogreftler en çok iliak kanattan alınmaktadır. Bunun dışında, radius distal ucundan, tibia distalinden veya Gerdy tüberkülünden de alınabilmektedir [56].

Kortikal otogreftler, kanselöz kemik greftlerine göre daha az biyouyumludur. Kortikal kemiğin daha az gözenekli olması nedeniyle greftin içine doğru damarlanma olması daha zordur. Kortikal kemik, trabeküler kemikten daha az miktarda osteoblastik progenitor hücre içermektedir. Kortikal kemikte bulunan hücreler, besin aktarımı ve oksijen difüzyonunun az olması sebebiyle nakil işlemlerine direnci düşüktür. Ancak kanselöz otogreftlere göre mekanik olarak daha dayanıklıdırlar [57].

2.5.2.2 Allogreftler

Allogreftler, gözenekli yapılarında endotelial ve progenitör hücrelerin tutunduğu pek çok alana sahiptirler. Allogreftler, kemik matriks içerisinde büyüme faktörleri ve osteoindüktif özelliklere sahip az sayıda kemik morfojenik proteini içerirler.

Allogreftlerin işlenmesindeki sınırlamalar sebebiyle hastalık geçişine ve immünolojik reaksiyonlara sebep olabilirler. Hastalık geçişini azaltmak için yapılan işlemler ise allogreftlerin canlılığının kaybolması, osteoindüktivite, osteokondüktivite yeteneğinin azalması, mekanik özelliklerin azalması ve yeni kemik oluşmasının engellenmesine yol açar. Ayrıca işlenmiş allogreftler otogreftlere göre insan dokusuna daha uzak oldukları için alıcı tarafından kabul edilmeleri kolay olmaz ve birleşme ihtimali otogreftte göre düşüktür. Bunun dışında otogreftlere göre yavaş rezorbe olurlar ve otogreftlerdeki gibi tam olarak kemiğin yerine kullanılmazlar. Ayrıca allogreftlerin özelliği donör kemiğin özelliğine, yaş ve cinsiyetine veya donörün alındığı bölgeye göre de değişir.

Bunların dışında allogreftlerin standart otogreftlere göre otogreftin alımı esnasında yaşanan morbiditenin önlenmiş olması, büyük kemik kayıpları için yeterli greftin sağlanabilmesi ve jel, macun veya fiber gibi pek çok farklı şekilde işlenebilmeleri açısından otogreftlere göre avantajlara sahiptir.

2.5.2.3 Demineralize Kemik Matriksi

Demineralize kemik matriksi (DKM), farklı derecelerde osteoindüktif ve osteokondüktif bir malzeme olarak kemik boşluklarını veya kayıplarını doldurmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu yapıların biyolojik aktivitesi ekstrasellüler matrikste bulunan büyüme faktörleri ve proteinlerle olur. Hızlı şekilde damarlanma özelliğine sahiptirler ve otolog kemik ilikleri için

iyi bir taşıyıcıdırlar. Demineralize kemik matrikslerinin osteoindüktiflik derecesi donöre, kemiğin işlenmesine, saklanma şekline veya sterilizasyon yöntemine göre değişebilmektedir. DKM'ler; granül, macun veya jel yapıda, ezilmiş olarak ve dondurulup-kurutulmuş olarak kullanılabilirler. Bu yapılar hyaluronik asit (HA), jelatin veya gliserol ile karıştırılarak elde edilmektedir.

Demineralize kemik matriksleri otogreftlere benzer iyileşme gösterebilmektedirler. Yaşanan kemik kaybının büyük olduğu durumlarda otogreftlerin miktarını arttırmak için kansellöz greft ile birlikte karıştırılarak kullanılabilirler. Bunun yanı sıra otogreftin kullanılmadığı durumlar için alternatifler [56].

2.5.2.4 Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP)

Kemik morfojenik proteinleri, kollajen olmayan ve düşük molekül ağırlığına sahip glikoproteinlerdir. Çok sayıda büyüme ve farklılaşma faktörü içeren bir grup olan TGF- β (transforme edici büyüme faktörü- β) grubuna ait dimerik moleküllerden oluşurlar. Bu grubun BMP-2'den BMP-8'e kadar yedi üyesi vardır. Bunların dışında osteojenik proteinler veya kıkırdak kaynaklı morfojenik proteinler de içerirler.

BMP'ler kemik proteinlerinin ağırlıkça küçük bir kısmını oluştururlar. Demineralize kemik matriksleri BMP'lerin karışımı ile oluşurlar ve immünojeniktirler. Fakat saf kemik morfojenik proteinleri immünojenik değildir.

BMP'ler klinik kullanımda saflaştırılmış kemik ekstratlarından elde edilirler. rh-OP-1, rh-BMP-2 ve rh-BMP-7 çalışmakta olan kemik morfojenik proteinlerdir.

İlerleyen zamanlarda BMP'ler omurga füzyonu veya revizyon artroplastisinde veya enjekte edilebilir yapılarla minimal invaziv cerrahide yaygın kullanım alanı bulacaktır.

2.5.2.5 Sentetik Greftler

Kemik doku mühendisliğinde sentetik greft malzemesi olarak kalsiyum fosfat seramikleri (TCP), HA ve kalsiyum sülfatlar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Trikalsiyum fosfat yapıları, α ve β olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. α -trikalsiyum fosfat bir yılı bulan sürelerde vücut tarafından absorbe edilmekte ve bazı durumlarda vücut içerisinde hidroksiapatite dönüşebilmektedir. β -trikalsiyum fosfat ($\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$) ise birkaç ay içerisinde absorbe edilmekte ve diğer malzemelere göre yüksek biyouyumluluk göstermektedir. Doku mühendisliğinin en büyük problemi olan damarlanma β -trikalsiyum fosfatın mikro gözenekli yapısı sayesinde bölgeye implante edilip kan akışını hemen sağlayabilmesiyle iyileştirilebilmektedir. Ayrıca trikalsiyum fosfat seramikleri hidroksiapatitlere oranla daha

hızlı rezorbe olma yeteneğine sahiptirler. Bu yapılar gözenek miktarını arttırmak ve gözenekler arasında bağlantı kurarak kemik hücrelerinin içerisinde ilerlemelerini sağlamak amacıyla granül formunda kullanılırlar. Bu yapıların kemik onarım malzemeleri içerisinde bulunması kemik yapısında bulunan osteoklast hücrelerini uyarır. Osteoklast aktivitesinin artmasına bağlı olarak osteoblastik aktivite de artar ve yeni kemik oluşumu meydana gelir.

Hidroksiapatitler kemikten veya bazı deniz mercanı türlerinden elde edilmektedir. Bu yapılar üç boyutlu yapılar olarak kemik benzeri gözenekli doku sunarlar. Birbirine bağlı gözeneklere sahip olmaları sebebiyle hücrelerin doku iskelesi üzerinde büyümelerine olanak verirler. Hidroksiapatitler yavaş rezorbe olan kalsiyum fosfat seramiği grubundadırlar. Klinik olarak hidroksiapatitin yavaş emilimi dezavantajdır. Bu nedenle emilimini arttırmak için değişik uygulamalar geliştirilmiştir. Bunlar; kalsiyum karbonatın dış kabuğunun hidrotermal olarak hidroksiapatite çevrildiği implantlar, hidroksiapatitten elde edilen bifazik kalsiyum fosfat seramikler ve hidroksiapatit ile TCP karışımı olan kompozit materyaller olarak sayılabilirler [58].

Bu dezavantajları ortan kaldırmak ve hücre tutunmasını arttırmak, bunun yanı sıra daha biyoyumlu hale getirmek amacıyla kollajenlerle birlikte kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [59,60].

Bahsedilen bu seramik yapıları sert doku ile biyoyumludurlar, osteokondüktif özellikleri yüksektir, biyoaktif ve antijenik ve sitotoksik özellik taşımazlar. Bu özellikleri ile doku iskelesi olarak gözenekli yapılara ve kemik implantlarına dahil edilebilirler [61-63].

Kompozit doku iskelelerinde ise iskele özelliklerinin iyileştirilmesi için iki veya daha fazla malzeme birleştirilerek dokunun fizyolojik ve mekanik ihtiyacı sağlanabilir. Polimerik yapının sağladığı avantajların yanı sıra, hacimsel olarak farklı oranlarda sentetik greft yapıları ilave edilerek elde edilen doku iskelelerinin mekanik dayanımları ayarlanabilir. Malzeme biyoaktiflik derecesi kompozit doku iskelelerinin performansında etkili bir parametredir. Malzemenin şekli, boyutu, yüzey alanı, içerdiği malzemelerin hacimsel oranları ile biyoaktiflik derecesi ayarlanabilir. Sentetik greftlerin eklenmesiyle polimerin bozunma davranışı değiştirebilir [64].

3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar üç ana başlıkta toplanmıştır. İlk olarak sarf malzeme ve kimyasallar temin edilerek, poliüretan (PU) kemik yapıştırıcısının sentezi gerçekleştirilmiş ve bu yapıya BMT Calsis A.Ş. tarafından farklı boy dağılım aralığına (0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm) ve ağırlıkça farklı yüzdelere (%20, %30 ve %40) sahip β -trikalsiyum fosfat partikülleri dahil edilerek PU/ β -TCP tabanlı kompozit doku iskeleleri hazırlanmıştır. İkinci aşamada, PU kemik yapıştırıcısının ve üretilen kompozit doku iskelelerinin fiziksel, kimyasal, termal ve mekanik özelliklerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinin kesit ve yüzey görüntülerinin alınması ve seramik fazın dağılımının gözlenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, gözenek yapısının incelenmesi ve porozite değerlerinin belirlenmesi amacıyla mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT) analizi yapılmıştır. Doku iskelelerinin kimyasal analizi için Hidrojen-Nükleer Manyetik Rezonans (^1H -NMR) ve Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)'den yararlanılmış, termal analizi için ise Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi yapılmıştır. Poliüretan kemik yapıştırıcısının kemiğe yapışma mukavemetini belirlemek amacıyla sığır kaburga kemikleri kullanılarak mekanik çekme testi yapılmıştır. Ayrıca doku iskelelerinin mekanik dayanımını belirleyerek poliüretan yapısına eklenebilecek en uygun beta-trikalsiyum fosfat miktarını belirlemek amacıyla basma testi yapılmıştır.

Deneysel çalışmaların son aşamasında ise karakterizasyonu tamamlanan doku iskelesi adaylarından β -TCP içermeyen ve en yüksek oranda (%40 a/a) β -TCP içeren gruplara MG63 insan osteosarkoma hücre hattı ekilerek hücre kültürü (*in vitro*) analizleri ve sitotoksisite analizi yapılmış, Alamar Mavisi yöntemi ile hücre canlılığı ve proliferasyonu tayin edilmiştir.

3.1 Poliüretan Kemik Yapıştırıcısı ve β -TCP İçeren Doku iskelelerinin Hazırlanması

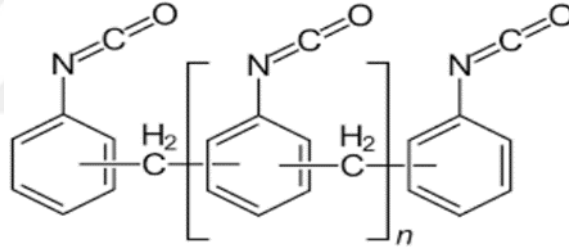
Tez çalışması kapsamında poliüretan kemik yapıştırıcısı ve PU/ β -TCP tabanlı kompozit malzemenin hazırlanması çalışmaları TÜBİTAK 1005 215S835 numaralı projenin alt başlıklarından birini oluşturmuş ve ilgili sonuçlar proje raporuna da yansıtılmıştır. Sentez amacıyla, Poliol, Polimerik metilen difenil diizosiyanat (pMDI), Distile Su ve β -TCP kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan Poliöl, Capa® isimli ticari ürün olup Perstrop (İsveç) firmasına aittir. İzosiyanat (Polimerik metilen difenil diizosiyanat (pMDI)) Desmodur® isimli ticari bir ürün olup Aug Hedinger (Almanya) firmasından, β -TCP ise (0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül büyüklüğü) SupraBone® isimli ticari bir ürün olup, BMT Calsis Sağlık Teknolojileri A.Ş.'den temin edilmiştir.

Poliüretan tabanlı kemik yapıştırıcısının hazırlanması amacıyla pMDI, distile su ve poliöl cam bir reaktör içerisinde sırasıyla karıştırılmış ve reaksiyon sıcaklığı ölçülerek uygun sıcaklık aralığının dışına çıkan formülasyonlar ekarte edilmiştir.

Malzemenin hazırlanması aşamasında kullanılan kimyasallara ait özellikler ve oluşan tepkimeler aşağıda belirtildiği gibidir.

1. Polimerik metilen difenil diizosiyanat (pMDI): Ağırlıkça % 30 ila 80 arasında 4,4'-metilen difenil izosiyanat içeren metilen difenil diizosiyanat (MDI) olup ağırlıkça geri kalan kısmı MDI oligomerleri ve homologlarını içerir.



Şekil 3.1 Polimerik metilen difenil diizosiyanat kimyasal yapısı

2. Poliöl: Kaprolakton monomerinden türetilmiş düşük molekül ağırlıklı primer hidroksil grupları olan bir poliöldür. Genel özellikleri şu şekildedir:

Molekül ağırlığı : 200,50 g

Hidroksil değeri :mg KOH/g 279,8

Viskozite : Düşük

Genel formül :HO-R-OH

Poliüretan sentezi için kullanılan izosiyanat ile poliolün genel reaksiyon mekanizması aşağıda belirtildiği gibidir:



Şekil 3.2 İzosiyanat ve poliol arasında gerçekleşen üretan reaksiyonu

Poliüretan sentezi gerçekleşirken polioldeki oksijen atomu izosiyanat molekülündeki pozitif yüklü karbon atomuna atak yapar ve N=C çift bağı açılır. Oksijen atomu karbon atomuna bağlanırken hidrojen atomu da azota bağlanır ve reaksiyon sonucunda üretan bağı oluşur.

Sentez kapsamındaki bir diğer reaksiyon izosiyanat ile su arasındadır:



Poliüretan sentezinde kullanılan su, izosiyanat ile reaksiyona girerek karbondioksit çıkışını sağlamakta ve doku iskelesinin nihai formunun gözenekli hale gelmesine yardımcı olmaktadır. Bu yüzden istenilen gözenek boyutu ve miktarına göre reaksiyona girecek izosiyanat ve su oranı iyi ayarlanmalıdır.

Poliüretan sentezi amacıyla pek çok farklı formülasyon denenmiş ve nihai ürüne aşağıdaki yüzdeleri içerecek şekilde karar verilmiştir.

- a. Prepolimer Hazırlanışı: Kütlece yüzde içeriğinin %35-%45 oranında kaprolakton monomeri içermesi amaçlanmıştır.

$$\% \text{ kaprolakton} = (2,0037 \text{ g kaprolakton} / 4,8337 \text{ g prepolimer}) \times 100 = \% 41,45$$

- b. Su oranı: Kütlece yüzde içeriğinin %15-%20 oranında su içermesi amaçlanmıştır.

$$\% \text{ su} = (1,015 \text{ g su} / 5,8352 \text{ g toplam kütle}) \times 100 = \%20$$

Nihai formülasyona karar vermek amacıyla yapılan deneylerde katalizör kullanımı da denenmiştir ancak poliüretan sentezinde reaksiyonun çok hızlı gerçekleşmesine sebep olarak gözenek boyutunu çok arttırmasına karşın mekanik dayanımı gözle görülür şekilde düşürdüğü için katalizör kullanılmamasına karar verilmiştir.

Çalışmalar sonucunda istenilen fiziksel özelliklere ulaşılmıştır. Bir sonraki aşamada formülasyona β -trikalsiyum fosfat eklenerek çalışmalara devam edilmiştir.

Poliüretan/seramik tabanlı kompozit doku iskelelerinin sentez çalışmalarında, 0,5-1mm, 1-2 mm ve 2-4 mm boyutlarında ve ağırlıkça %20, %30 ve %40 oranında β -TCP kullanılmıştır.

0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutunda β -TCP içeren gruplara ait yapılan deneylerde kullanılan kimyasal ve β -TCP miktarları sırasıyla Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.1 PU/ β -TCP sentezi için gerçekleştirilen ağırlıkça farklı yüzdelere sahip 0,5-1 mm β -TCP içeren deneylerde kullanılan kimyasal oranları

Deney No	pMDI	Poliol	Su	β -TCP
1.1	2,83 g	2,00 g	1,00 g	1,45 g (%20 β -TCP)
1.2	2,83 g	2,00 g	1,00 g	2,50 g (%30 β -TCP)
1.3	2,83 g	2,00 g	1,00 g	3,88 g (%40 β -TCP)

Çizelge 3.2 PU/ β -TCP sentezi için gerçekleştirilen ağırlıkça farklı yüzdelere sahip 1-2 mm β -TCP içeren deneylerde kullanılan kimyasal oranları

Deney No	pMDI	Poliol	Su	β -TCP
2.1	2,83 g	2,00 g	1,00 g	1,45 g (%20 β -TCP)
2.2	2,83 g	2,00 g	1,00 g	2,50 g (%30 β -TCP)
2.3	2,83 g	2,00 g	1,00 g	3,88 g (%40 β -TCP)

Çizelge 3.3 PU/ β -TCP sentezi için gerçekleştirilen ağırlıkça farklı yüzdelere sahip 2-4 mm β -TCP içeren deneylerde kullanılan kimyasal oranları

Deney No	pMDI	Poliol	Su	β -TCP
3.1	2,83 g	2,00 g	1,00 g	1,45 g (%20 β -TCP)
3.2	2,83 g	2,00 g	1,00 g	2,50 g (%30 β -TCP)
3.3	2,83 g	2,00 g	1,00 g	3,88 g (%40 β -TCP)

Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir ve deneyler sırasında reaksiyon sıcaklığı 50 (+/- 5) °C olarak ölçülmüştür.

3.2 Kemik Yapıştırıcısı ve Doku İskelesi Karakterizasyonu

Bu bölüm poliüretan kemik yapıştırıcısı ve farklı boyut (0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm) ve ağırlıkça farklı yüzdelerde (%20, %30 ve %40) β -TCP içerecek şekilde hazırlanmış PU tabanlı doku iskelesi adaylarının kimyasal, termal, mekanik ve morfolojik özelliklerini tespit etmek amacıyla yapılan karakterizasyon analizlerini içermektedir.

3.2.1 Kimyasal ve Termal Karakterizasyon Analizleri

Tez çalışması kapsamında hazırlanan poliüretan kemik yapıştırıcısı ve PU/ β -TCP tabanlı doku iskelesi adaylarının içeriğindeki bileşenleri, fonksiyonel grupları belirlemek ve β -TCP partikülleri ile poliüretan malzeme arasındaki etkileşimi görmek amacıyla Hacettepe Üniversitesi bünyesinde Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, Thermo Fisher, Amerika) analizi gerçekleştirilmiştir. Numuneler potasyum bromür (KBr) ile toz haline getirilip karıştırılarak preslenmiş ve cihaza yerleştirilmiştir.

PU/ β -TCP tabanlı doku iskelesi adaylarından en uygun olanı belirlemek ve poliüretan yapısını kimyasal olarak analiz etmek amacıyla FTIR analizine ek olarak, manyetik alana maruz kalan atom çekirdeklerinin elektromanyetik ışınları absorblama ilkesine dayanan ^1H -NMR tekniği kullanılmıştır. Analiz için Hacettepe Üniversitesi bünyesinde bulunan Bruker marka AV 400 MHz NMR cihazı kullanılmış olup ambient sıcaklıkta analiz gerçekleştirilmiştir. Çözücü olarak %99,8'lik CHCl_3 , iç standart olarak da tetrametilsilan (TMS) kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında hazırlanan doku iskelesi adaylarının termal davranışlarını incelemek amacıyla ise Orta Doğu Teknik Üniversitesi bünyesindeki Merkez Laboratuvarı'nda Perkin Elmer Diamon DSC Cihazı ile analiz yapılmıştır. Hava ortamında gerçekleştirilen analizde ısıtma hızı $10^\circ\text{C}/\text{dakika}$ olarak ayarlanmıştır.

3.2.2 Mekanik Karakterizasyon Analizleri

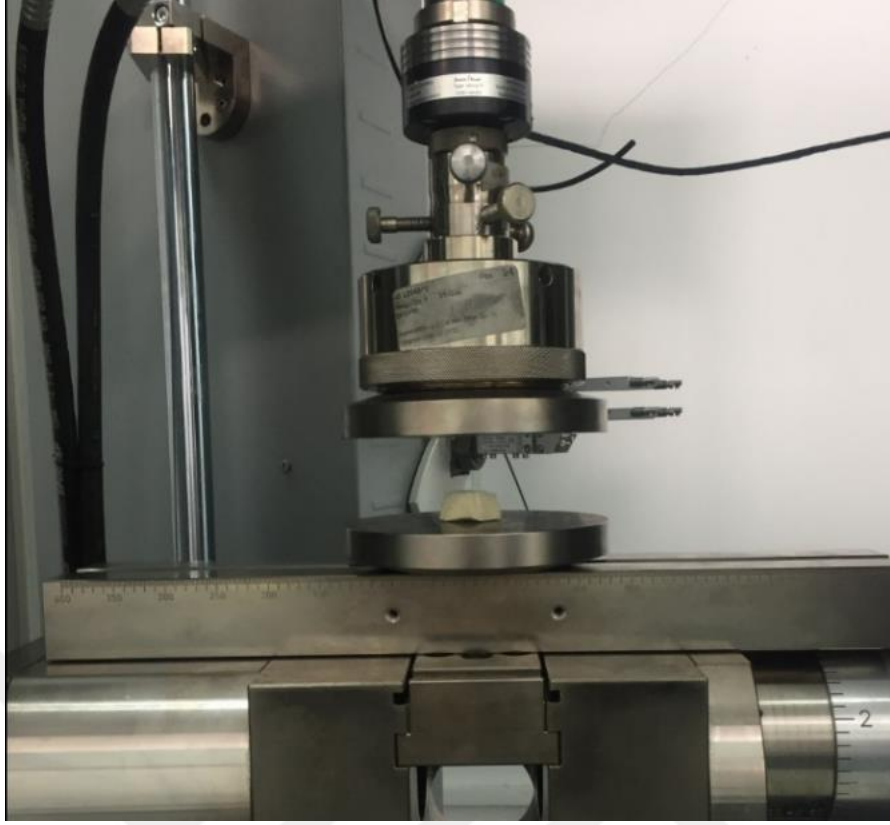
Tez çalışması kapsamında hazırlanan poliüretan kemik yapıştırıcısının kemiği yapıştırma mukavemetini belirlemek amacıyla sığır kaburga kemikleri kullanılarak çekme testi (Zwick Z010, Almanya) yapılmıştır.

Çekme testi için 110 mm yüksekliğe sahip sığır kaburga kemikleri orta noktalarından kesilmiş ve poliüretan kemik yapıştırıcısı ile yapıştırılmıştır. Analiz üç tekrarlı olacak şekilde 10 N'luk bir yük altında çekme hızı 10 mm/dakika yükleme hızı ile gerçekleştirilmiştir. Analize ait görüntü Şekil 3.3' te verilmiştir.



Şekil 3.3 Çekme testine ait görüntü

Tez çalışması kapsamında hazırlanan β -TCP içermeyen ve 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında ve ağırlıkça %20, %30 ve %40 yüzdelerde β -TCP içeren 10 adet PU doku iskelesinin mekanik mukavemetini belirlemek amacıyla basma testi (Zwick/Roell Z250, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Analize ait görüntü Şekil 3.4' te verilmiştir.



Şekil 3.4 Basma testine ait görüntü

Basma testi için 5 mm yüksekliğinde 10x10mm boyutlarında kare olacak şekilde numuneler hazırlanmıştır. 10 N'luk bir yük altında yükleme hızı 5 mm/dakika yükleme hızı ile gerçekleştirilen analizlerde üçer tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

3.2.3 Morfolojik Karakterizasyon Analizleri

Kompozit doku iskelelerin iç mimarisi ve yüzey topoğrafyasını ayrıntılı bir şekilde analiz etmek diğer bir deyişle gözenek dağılımını incelemek amacıyla Orta Doğu Teknik Üniversitesi Bünyesinde bulunan Merkez Laboratuvarları'nda QUANTA 400 F cihazı ile SEM analizi yapılmıştır. Hazırlanan numunelerin yüzeyi iletkenliği artırmak amacıyla altın-paladyum alaşımı ile kaplanmıştır. SEM analizi ile farklı noktalardan 50x, 100x, 250x ve 1000x büyütmelerde görüntüler elde edilmiştir.

SEM analizinin yanı sıra β -TCP seramikleri ile karıştırılan PU bazlı kompozit malzeme formülasyonlarında reaksiyon neticesinde ortaya çıkan gazın oluşturacağı gözenek yapısının 3 boyutlu incelenmesi ve gözenek oranının yüksek çözünürlükte tayini için μ -CT analizine başvurulmuştur.

μ -CT analizleri için 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında ve ağırlıkça %20, %30 ve %40 oranında β -TCP içeren numuneler kullanılmıştır. μ -CT analizi Orta Doğu Teknik Üniversitesi bünyesindeki BİOMATEN' de SkyScan 1172 cihazı ile 60 kv voltaj kaynağı ve 167 μ A akımla yapılmıştır.

3.2.4 *In vitro* Hücre Kültürü Testleri

Tez çalışması kapsamında üretilen 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında ve ağırlıkça %20, %30 ve %40 oranında β -TCP içeren malzemelerin kemik doku mühendisliğinde kullanım potansiyellerinin araştırılması amacıyla ikilenme süresi kısa ve dayanıklılığı yüksek MG63 hücreleri ile *in vitro* çalışmalar yürütülmüştür. Çalışma kapsamında kullanılan hücreler daha önce laboratuvarımızda yürütülen çalışmalar kapsamında 4. pasaj (P4) halinde ECACC firmasından (İngiltere) temin edilmiş, pasajlanarak çoğaltılmış ve dondurulmuştur. Hücreler %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 Antibiyotik-Antimikotik içerikli düşük glikozlu DMEM besi ortamında kültüre edilmiştir.

Ağırlıkça %20, %30 ve %40 oranında ve farklı boyutlarda (0,5-1 mm, 1-2 mm, 2-4 mm) β -TCP içeren PU doku iskeleleri arasından farklı boyutlarda en yüksek (%40 a/a) β -TCP oranına sahip malzemeler seçilmiş ve 0,5 cm kalınlığında, 1 cm çapında disk şeklinde kesilerek *in vitro* çalışmalar için hazırlanmıştır. Kesilip şekillendirilen malzemeler %70'lik alkol çözeltisinde 2 saat süresince steril edilerek kültür işlemine alınmıştır. Hücre ekimi yapılacak güne kadar 75 cm²'lik hücre kültürü flasklarında çoğaltılmış hücreler, tripsin ile yüzeyden kaldırılmış ve 20 μ L içinde malzeme başına 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Hücre canlılığı ve proliferasyonunu tayin etmek amacıyla kültürün 1., 3., 7., ve 14. günlerinde Alamar Mavisi (ThermoFisher, Almanya) testi gerçekleştirilmiştir. Basitçe, hücre ekilmiş doku iskeleleri üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve yerine %10 Alamar mavisi içeren taze besi ortamı eklenerek 4 saat 37 °C'de CO₂ etüvünde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde her bir kuyucuktan 200 μ L örneklem alınarak 570 nm'de 610 nm referans alınarak mikropkaya okuyucuda okutulmuştur (BioTek, Amerika). Okutma işlemi bittiğinde aynı doku iskeleleri 1 kez PBS ile yıkanarak taze besi ortamı ilavesi ile kültüre devam ettirilmişlerdir. Böylece 14 gün boyunca aynı doku iskeleleri üzerinde üreyen hücrelerden ölçüm alınmıştır (n=3). Elde edilen değerler, zamana bağlı absorbans olarak grafiğe aktarılmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında hücre ekilmemiş doku iskeleleri %10

Alamar mavisi içeren taze besi ortamı ile etkileştirilerek inkübe edilmiştir ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Poliüretan yapısının toksik olup olmadığını tespit etmek amacıyla sitotoksosite testi yapılmıştır. Sitotoksosite testi %40 oranında (a/a) 1-2 mm boyutunda β -TCP içeren PU doku iskelelerine L929 fare fibroblast hücreleri (NCTC clone 929, ATTC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pasaj 34 halinde sıvı azot ortamında saklanan hücreler hızlı bir şekilde 37 °C’de çözülüp %10 FBS (Capricorn), %1 Antibiyotik (Capricorn) ve %1 L-glutamin içeren yüksek glikozlu DMEM (Capricorn) besiyerinde, 75 cm²’lik flasklar içinde, 37 °C’de, %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Belirli bir üreme yoğunluğuna ulaşan hücreler pasajlanarak 24 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Sitotoksosite analizi ISO 10993-2 standardı gereğince elüsyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Test edilecek malzemeler öncelikle % 70 (h/h) alkol ile 2 saat boyunca steril edilmiştir. Takiben; ekstraksiyon besiyeri hazırlamak için 0,8 g malzeme 4 mL serumsuz, antibiyotiksiz besi ortamına eklenmiştir ve 37 °C’de, karbondioksit etüvünde 24 saat boyunca bekletilmiştir. Filtre edilen ekstraksiyon besiyeri ortamına yukarıda bahsi geçen oranlarda serum, antibiyotik ve L-glutamin katkısı sağlanarak 24 saat kültüre edilmiş 24 kuyucuklu kültür kabındaki hücreler ile etkileştirilmiştir ve hücreler 24 saat daha kültüre edilmişlerdir. Çalışma kapsamında ekstraksiyon besiyerinin seyreltilmesiyle farklı derişimler hazırlanmıştır ve sitotoksosite analizi malzeme yoğunluğuna bağlı olarak gerçekleştirilmiştir.

24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besi ortamı atılıp, 600 μ L serumsuz, antibiyotiksiz besi ortamı ve 60 μ L MTT (5 mg/mL) ilave edilmiştir ve 4 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Süre bitiminde besi ortamı uzaklaştırılan kuyucuklara, oluşmuş formazan kristallerini çözmek amaçlı 200 μ L DMSO ilave edilmiştir. Takiben, her bir kuyucuktan 100 μ L örneklem alınıp 96 kuyucuklu kültür kaplarında 570 nm absorbans değerinde okutulmuştur (BioTek, Amerika). Sonuçlar derişime bağlı elde edilen absorbans değeri olarak grafiğe aktarılmıştır.

4 DENEYSEL SONUÇLAR

Bu bölüm, Deneysel Çalışmalar bölümünde yapılan çalışmaların sonuç ve yorumlarını kapsamaktadır. Çalışmalarda ilk olarak, poliüretan kemik yapıştırıcısı ve PU/ β -TCP tabanlı doku iskeleleri hazırlanmış ve yapılan analizlerle yapıştırıcının kemik dokularını birbirine yapıştırma potansiyeli ve elde edilen poliüretan tabanlı doku iskelesi adaylarının kemik yenilenmesine olan etkisi belirlenmek istenmiştir. Hazırlanan kemik yapıştırıcısının kemik dokularını birbirine yapıştırma potansiyelini ve çekme mukavemetini belirlemek amacıyla sığır kaburga kemikleri kullanılmış, kırık kaburga kemikleri birbirine yapıştırılarak çekme testi uygulanmıştır. Ayrıca basma testi ile poliüretan tabanlı doku iskelelerinin mekanik dayanımları belirlenmiştir. Hazırlanan doku iskelelerinin kimyasal analizi için Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ve Hidrojen-Nükleer Manyetik Rezonans (^1H -NMR) analizleri, termal analizi için ise diferansiyel kalorimetri (DSC) analizi gerçekleştirilmiştir. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT) ile doku iskelelerinin morfolojik yapıları incelenmiştir.

Çalışmanın son bölümünde ise hazırlanan PU/ β -TCP doku iskelelerinden en yüksek oranda (%40 a/a) β -TCP içeren ve β -TCP içermeyen gruplara MG63 insan osteosarkoma hücre hattı ekilerek *in vitro* ortamda hücre kültürü analizleri gerçekleştirilmiş, sitotoksosite analizi yapılmış, Alamar Mavisi yöntemi ile hücre canlılığı ve proliferasyonu tayin edilerek elde edilen sonuçlar verilmiştir.

4.1 Kemik Yapıştırıcısı Karakterizasyonu

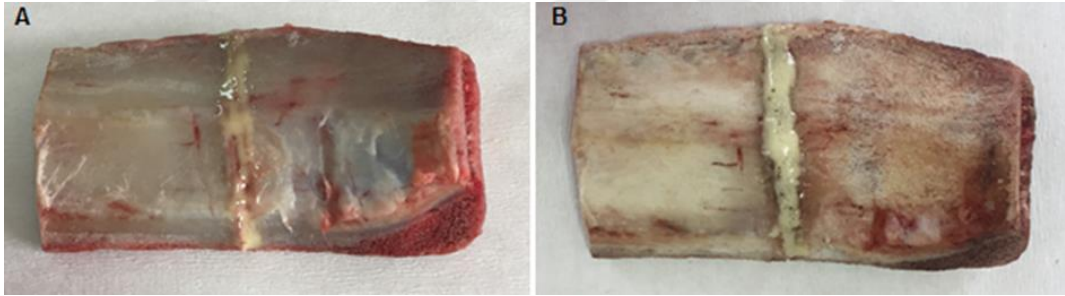
Kemik kırıklarının stabilize edilmesi için kullanılması düşünülen kemik yapıştırıcıları uygulanabilir olması için biyouyumlu bir yapıya sahip olmalı, biyolojik olarak emilebilir yapıda olmalı, bozunma ürünleri toksik olmamalı, kırık bölgesinde yüksek bağlanma mukavemeti göstermeli, iyi bir basma dayanımı için yeterli elastikiyete sahip olmalı ve nemli yüzeylere yapışabilmelidir. Bu özelliklerin yanı sıra kolay hazırlanabilmeli, hızlı kür olmalı ve polimerizasyon sırasında minimum ısı gelişimine sahip olmalıdır.

Bu bölümde, bahsedilen bu gereklilikler çerçevesinde oluşturulan poliüretan kemik yapıştırıcısının yapısal ve mekanik özellikleri karşılama durumu incelenmiş, kimyasal ve termal özellikleri karşılama durumu ile ilgili analiz sonuçları bölüm 4.2' de, *in vitro* hücre kültürü analizi sonuçları ise bölüm 4.3'te verilmiştir.

Şekil 4.1’ de hazırlanan kemik yapıştırıcısının sığır kaburga kemiğine yapıştırılmadan önceki görüntüsü, Şekil 4.2.A ve Şekil 4.2.B’de ise sığır kaburga kemiğine yapıştırıldıktan hemen sonra ve 1 gün sonrasına ait görüntüleri verilmiştir.

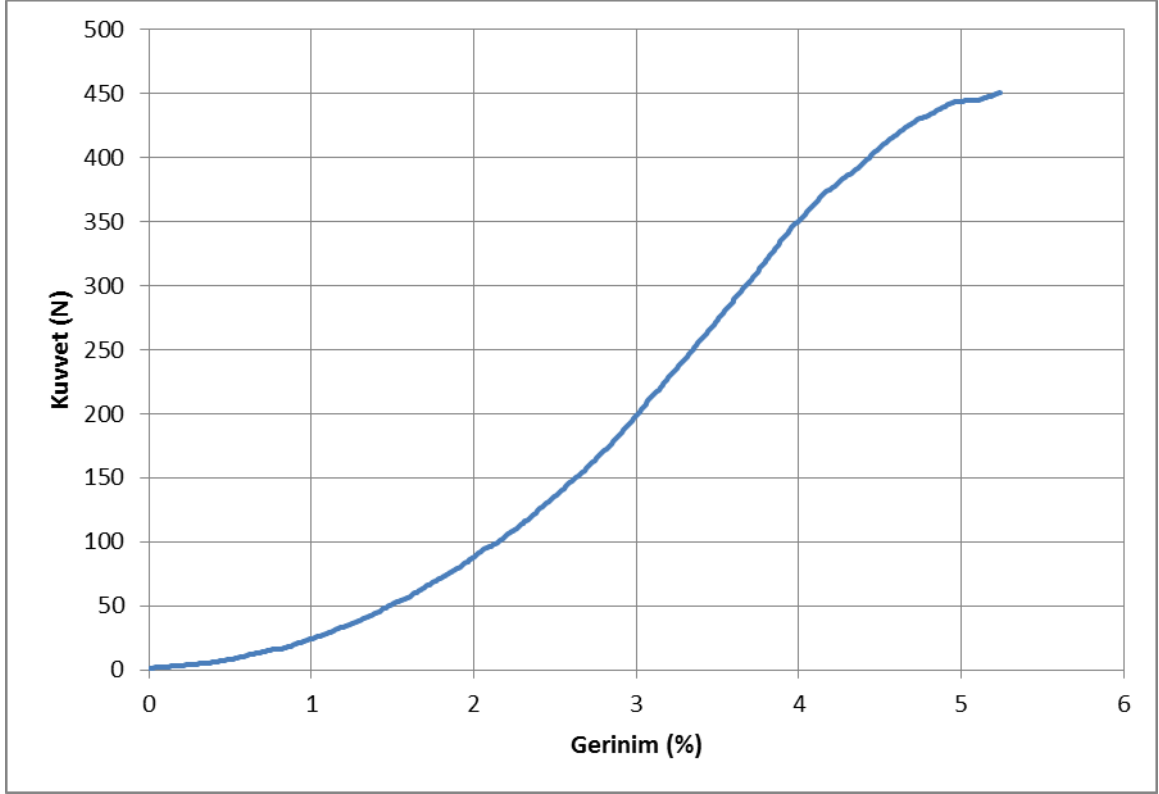


Şekil 4.1 Poliüretan kemik yapıştırıcısı ve sığır kaburga kemiğinin yapıştırılmadan önceki görüntüsü



Şekil 4.2 Sığır kaburga kemiğinin poliüretan kemik yapıştırıcısı ile yapıştırıldıktan hemen sonra (A) ve bir gün sonraki görüntüsü (B)

Poliüretan kemik yapıştırıcısının kırık sığır kaburga kemiklerine uygulanma işleminden sonra yapıştırıcının nemli yüzeylere yapışabilme, hızlı kür olma gibi yapısal özellikleri karşıladığı gözlenmiştir. Ayrıca poliüretan kemik yapıştırıcısının kırık kemiğe yapışma mukavemetini belirlemek amacıyla çekme testi yapılmıştır. 10 N’luk bir yük altında çekme hızı 10 mm/dakika yükleme hızı ile gerçekleştirilen analiz 3 tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen sonuçların aritmetik ortalaması alınmıştır. Çekme testi sonuçları Şekil 4.3 ve Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.3 Poliüretan kemik yapıştırıcı ile yapıştırılmış sığır kaburga kemiğine ait çekme analizi grafiği

Çizelge 4.1 Poliüretan kemik yapıştırıcı ile yapıştırılmış sığır kaburga kemiğine ait çekme analizi sonuçları (σ_c : çekme dayanımı (F_{max}/A), F_{max} : maksimum kuvvet, dL : uzama, h_0 : yükseklik, S_0 : kesit alanı)

	σ_c MPa	F_{max} N	F_{max} ' daki dL miktarı %	h_0 mm	S_0 mm^2
Poliüretan Kemik Yapıştırıcısı	1,3376	490,4446	5,2433	110	366,66

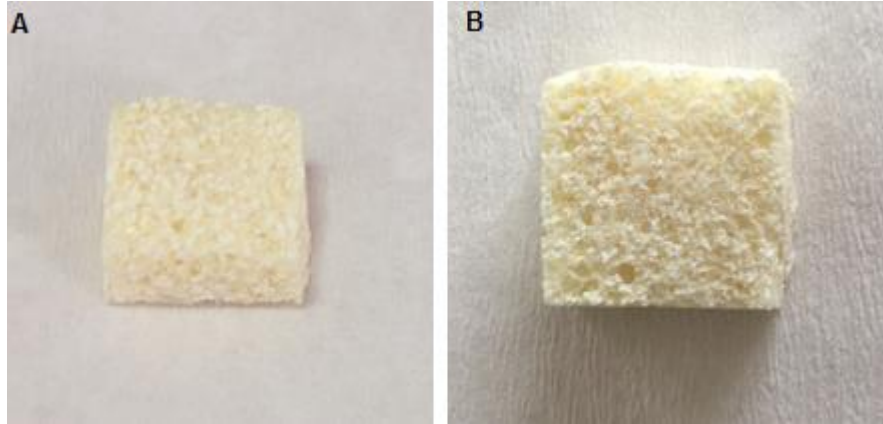
Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda poliüretan kemik yapıştırıcısının kırık bölgesine sıkı bir şekilde bağlanma özelliklerini karşıladığı, malzemenin en yüksek 490,4446 (N)' a kadar dayandığı ve yapışma mukavemetinin 1,34 MPa olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2 Doku İskelesi Karakterizasyonu

Doku mühendisliği çalışmalarında en önemli unsurlardan birisi vücut ile biyolojik olarak bütünlük sağlayabilecek yapıda bir doku iskelesi tasarlayabilmektir. Kemik doku mühendisliği göz önüne alındığında tasarlanacak doku iskelesi yerleştirildiği defekt bölgesinde hücre büyümesini sağlayabilmeli ve kemik onarımını hızlandırmak için uygun gözenek boyutu ve gözenekliliğe sahip olmalıdır. Ayrıca, besinlerin, gazların ve atıkların taşınması amacıyla bu gözenekler açık ve birbirleriyle bağlantılı bir yapıda olmalıdır. Doku iskelesi hücrelerin iskele içerisine göçünü sağlayarak hücrelerin iskele içinde çoğalmasını ve yeni doku oluşumu desteklemelidir.

Bunlara ek olarak, ikincil cerrahi operasyonları ortadan kaldırması açısından biyobozunur yapıda olmalı ve defekt bölgesine yerleştirildikten sonra yeni doku oluşana kadar bölgede kalmalı, hücrelere destek sağlamalı ve yeni doku oluşumu süresince de aynı hızla bozunabilmelidir.

Bu amaçla tasarlanan doku iskelelerinin söz konusu gereklilikleri karşılama durumu yapılan analizlerle incelenmiştir. Şekil 4.4' te 1-2 mm partikül boyutunda β -TCP içeren PU/ β -TCP kompozit doku iskelesine ait yandan (Şekil 4.4.A) ve üstten (Şekil 4.4.B) görüntüler verilmiştir.



Şekil 4.4 1-2 mm partikül boyutunda β -TCP içeren PU/ β -TCP kompozit doku iskelesi yandan (A) ve üstten (B) görünüm

Beta-trikalsiyum fosfat seramikleri ile karıştırılan poliüretan bazlı kompozit malzeme formülasyonlarında reaksiyon neticesinde ortaya çıkan gazın oluşturacağı gözenek yapısının 3 boyutlu incelenmesi ve gözenek oranının yüksek çözünürlükte incelenebilmesi için μ -CT analizine başvurulmuştur.

μ -CT analizleri için β -TCP içermeyen PU doku iskelesi ve 3 farklı boyutta (0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm) ve ağırlıkça 3 farklı yüzdede (%20, %30 ve %40) β -TCP içeren kompozit numuneler kullanılmıştır.

μ -CT sonuçlarına göre farklı partikül boyutlarında (%40 a/a) β -TCP içeren doku iskelesi toplam porozite değerleri ve açık gözenek oranları Çizelge 4.2’ de verilmiştir.

Çizelge 4.2 β -TCP partikül boyutlarına göre doku iskelesi gözeneklilik özellikleri

Doku İskelesi	Toplam gözeneklilik (%)	Açık gözeneklilik (%)
PU	71,19	71,19
PU/ 0,5-1 mm β -TCP	90,88	90,85
PU/ 1-2 mm β -TCP	94,05	94,03
PU/ 2-4 mm β -TCP	96,20	95,75

Cihaz yazılımı kullanılarak yapılan hesaplamalarla, grupların yaklaşık $267 \pm 25 \mu\text{m}$ 'lik bir ortalama gözenek boyutunu içerdiği bulunmuştur.

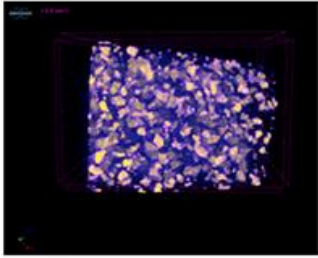
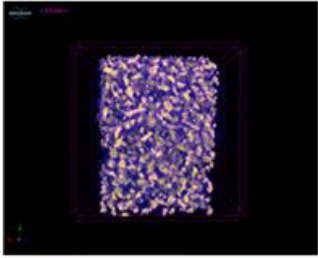
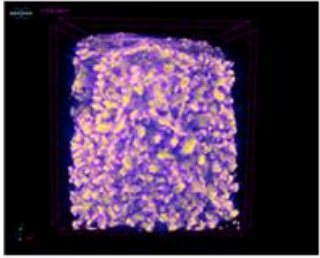
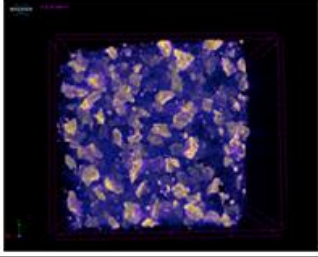
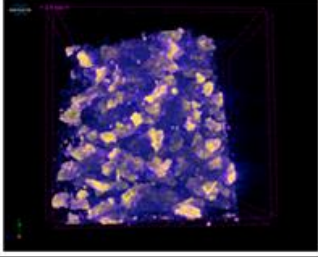
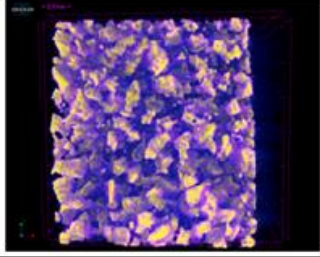
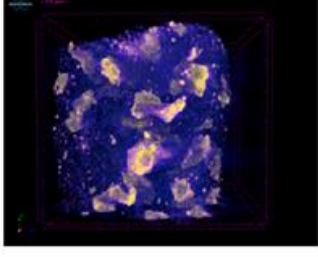
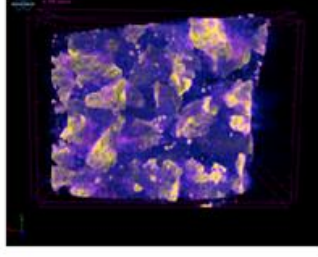
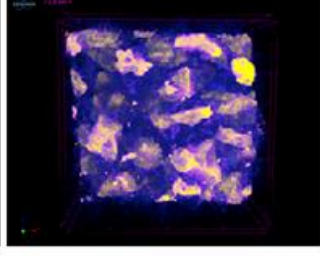
Şekil 4.5’ te 3 farklı boyut (0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm) ve ağırlıkça 3 farklı yüzdede (%20, %30 ve %40) β -TCP içeren PU tabanlı kompozit doku iskelelerine 3 boyutlu gözenek yapısı görülmektedir. Yüksek opaklığın bulunduğu bölgeler yapının beta-trikalsiyum fosfat seramikleri içerdiği kısımları göstermektedir.

μ -CT analizi sonuçları PU/ β -TCP doku iskelelerinin gözeneklerinin tamamen açık ve birbiriyle bağlantılı bir yapıya sahip olduğunu, organik ve inorganik fazlarının birbirleri ile iyi entegre olduğunu ve β -TCP partiküllerinin yapı içindeki homojen dağılımını

göstermektedir. Gözeneklerin açık ve birbirleriyle bağlantılı olması hazırlanan doku iskelelerinin hücre göçü için uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca hazırlanan doku iskeleleri besin, atık ve gaz taşınması için de oldukça uygun bir yapıya sahiptir.

μ -CT analizi sonuçlarında elde edilen toplam gözenek ve açık gözenek yüzdeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında poliüretan yapısına β -TCP eklenmesinin gözenek miktarını önemli ölçüde arttırdığı, β -TCP boyutunun ve yüzdesinin artmasının da gözenek miktarını arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Analiz sonuçları poliüretan/seramik kompozit yapılarının hücre migrasyonu için oldukça elverişli olduğunu göstermektedir.

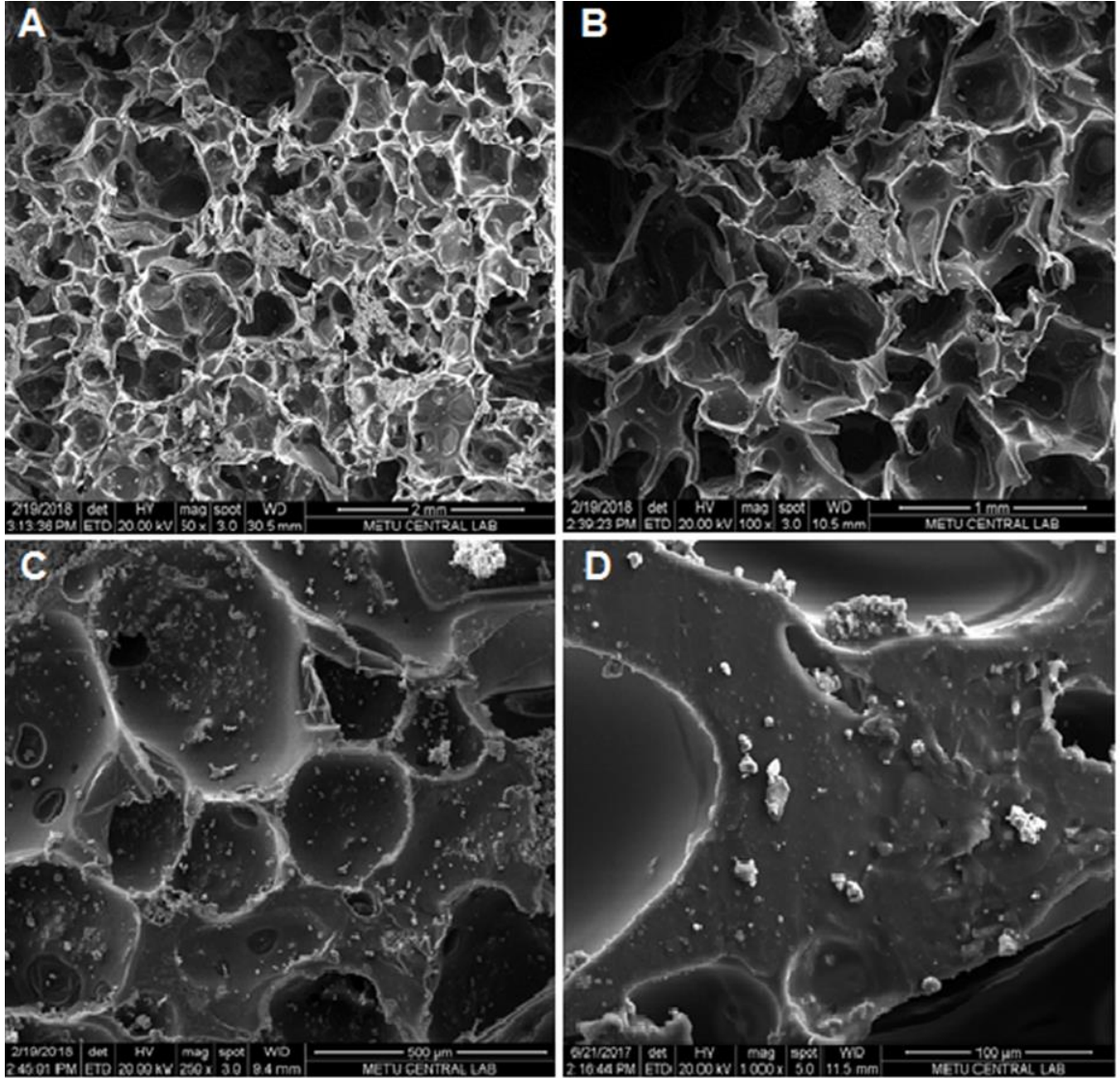
β -TCP Yüzdesi/ Boyutu	%20	%30	%40
0,5-1 mm			
1-2 mm			
2-4 mm			

Şekil 4.5 PU/ β -TCP doku iskelelerine ait μ -CT görüntüleri

Kompozit doku iskelelerin iç mimarisi ve yüzey topoğrafyasını daha ayrıntılı analiz etmek için, Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) kullanılmıştır.

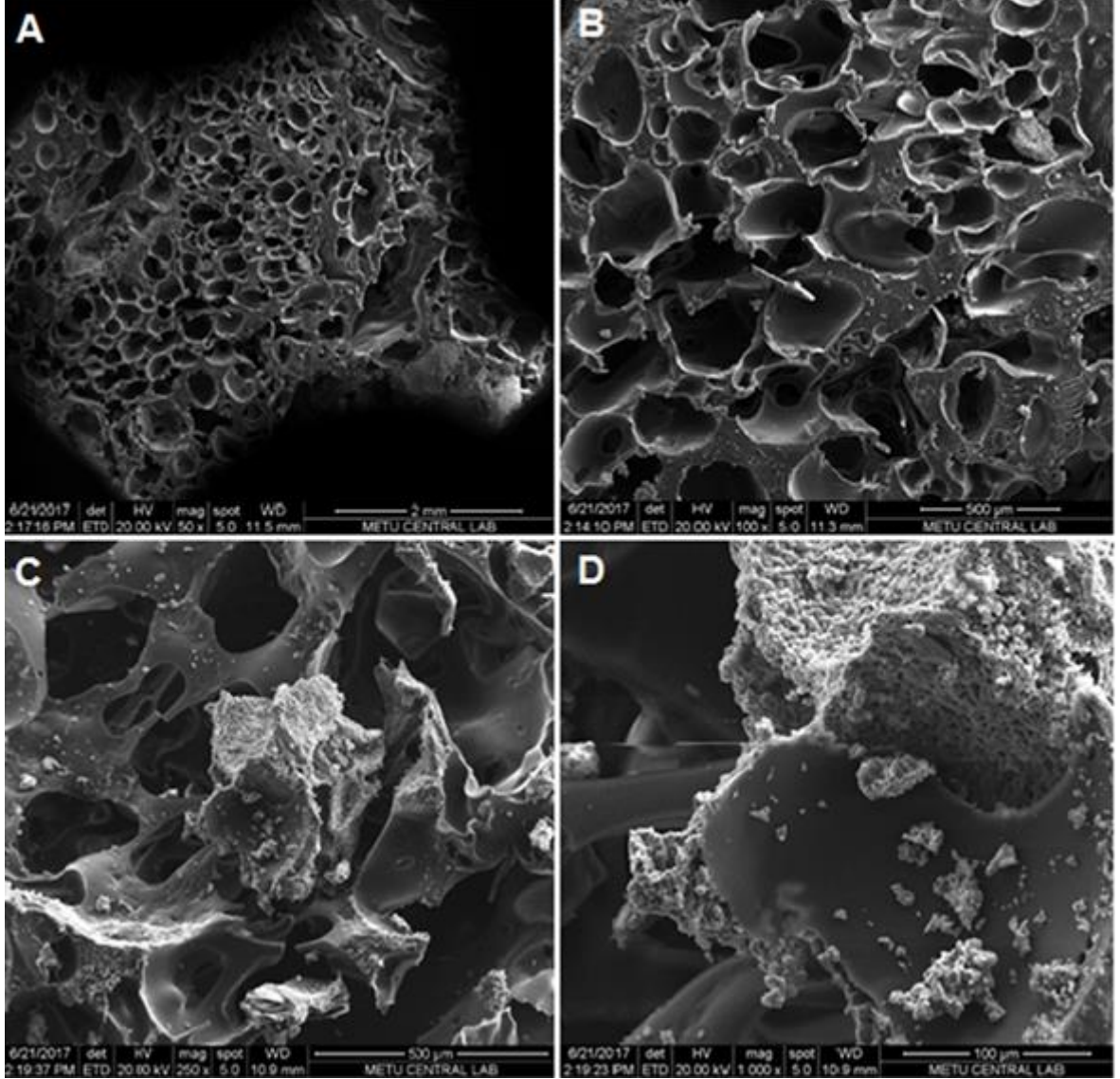
SEM analizi %20, %30 ve %40 (a/a) oranında 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerine uygulanmıştır. İletkenliği arttırmak amacıyla Poliüretan/seramik numuneleri Au-Pd ile kaplanmıştır.

Şekil 4.6' da 0,5-1 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerine ait SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.6.A doku iskelesinin 50X büyütme altındaki görüntüsü iken, Şekil 4.6.B aynı numunenin 100X, Şekil 4.6.C 250X, Şekil 4.6.D 1000X büyütme altında çekilen görüntüsüdür.



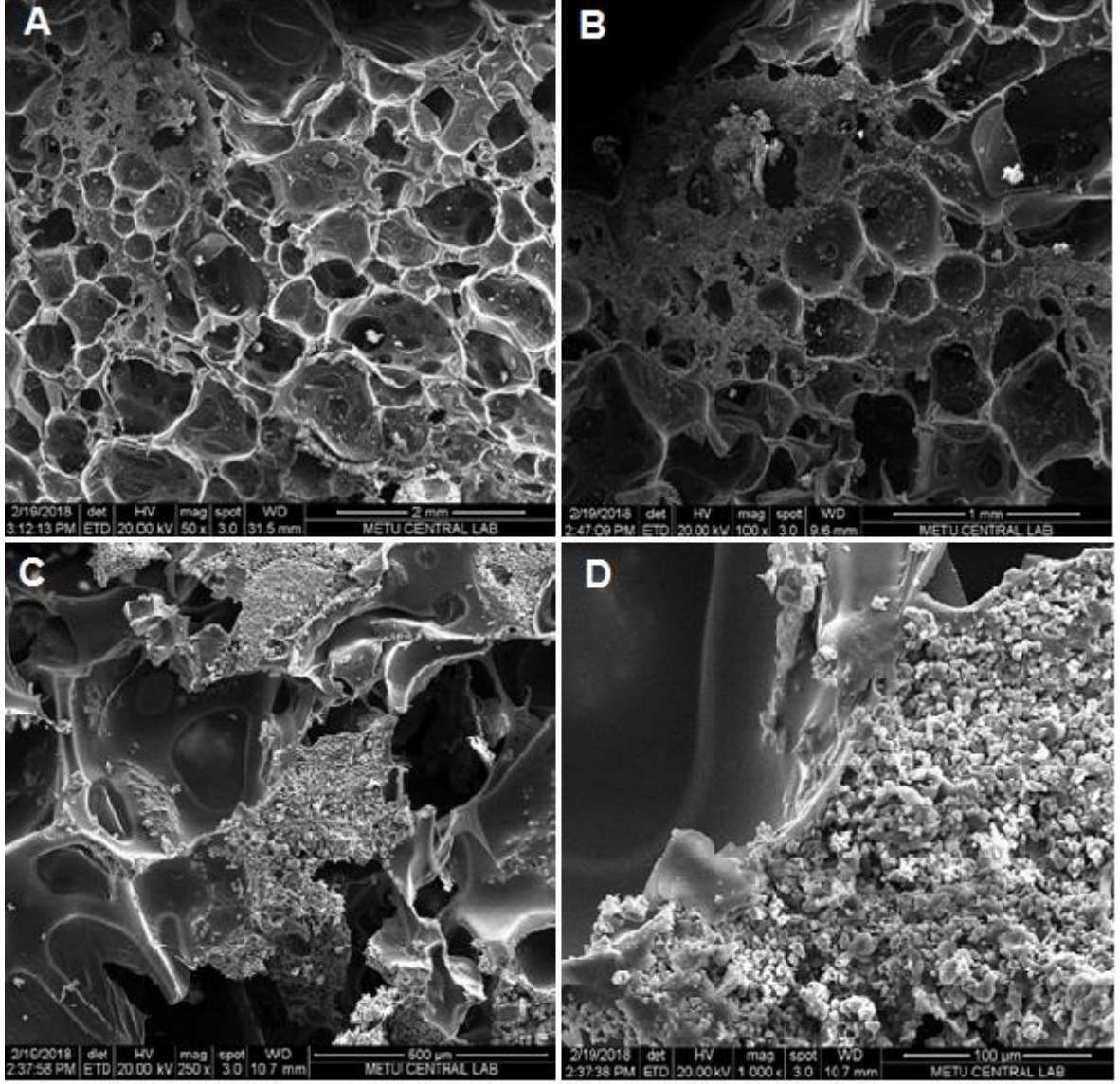
Şekil 4.6 0,5-1mm β -TCP içeren doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (A) 50, (B) 100, (C) 250, (D) 500X büyütme

Şekil 4.7' de 1-2 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerine ait SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.7.A doku iskelesinin 50X büyütme altındaki görüntüsü iken, Şekil 4.7.B aynı numunenin 100X, Şekil 4.7.C 250X, Şekil 4.7.D 1000X büyütme altında çekilen görüntüsüdür.



Şekil 4.7 1-2 mm β -TCP içeren doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (A) 50, (B) 100, (C) 250, (D) 500X büyütme

Şekil 4.8' de ise 2-4 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerine ait SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.8.A doku iskelesinin 50X büyütme altındaki görüntüsü iken, Şekil 4.8.B aynı numunenin 100X, Şekil 4.8.C 250X, Şekil 4.8.D 1000X büyütme altında çekilen görüntüsüdür.



Şekil 4.8 2-4 mm β -TCP içeren doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (A) 50, (B) 100, (C) 250, (D) 500X büyütme

Yukarıda 3 farklı partikül boyutunda β -TCP içeren doku iskelelerine ait Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilen SEM görüntüleri incelendiğinde gruplar arasında morfolojik olarak bir farklılık görülmemektedir. Elde edilen tüm SEM görüntülerinde gözenekler arasında yüksek derecede bağlantısallık bulunmaktadır. Gözenekler arasındaki bu bağlantısallık hazırlanan numunelerin yük taşıyan bölgelerde kullanılan iskeleler olarak hücre göçü ve doku entegrasyonu için en uygun şartlara izin verdiğini ortaya koymaktadır.

SEM görüntüleri açık bir şekilde seramik ve polimerik fazları göstermektedir. Görüntülerden anlaşıldığı üzere tüm malzeme keskin hatlar içermeyen, farklı milimetre altı çeşitli boyutlara sahip açık gözeneklerden oluşmaktadır.

Ayrıca inorganik ve organik fazın birbiri ile entegre olduğu, diğer bir ifadeyle polimer ile seramik parçacıkları arasında faz ayrımı olmadığı ve β -TCP parçacıkları içindeki mikro ve nano boyuttaki gözenekler de şekillerden görülmektedir.

Malzemenin açık gözenek yapısı ve yüksek gözeneklilik μ -CT sonuçları ile uyumludur. Dolayısıyla elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda yapının morfolojisinin doku iskelesi olarak kullanıma uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Tez çalışmasının devamında elde edilen doku iskelelerinin kimyası ve içeriğindeki safsızlıkların tayini için FTIR analizi yapılmıştır. Bu amaçla, numuneler pik vermeyen fakat numuneyi katı halde tutabilen KBr ile karıştırıldıktan sonra preslenerek analiz edilmiştir.

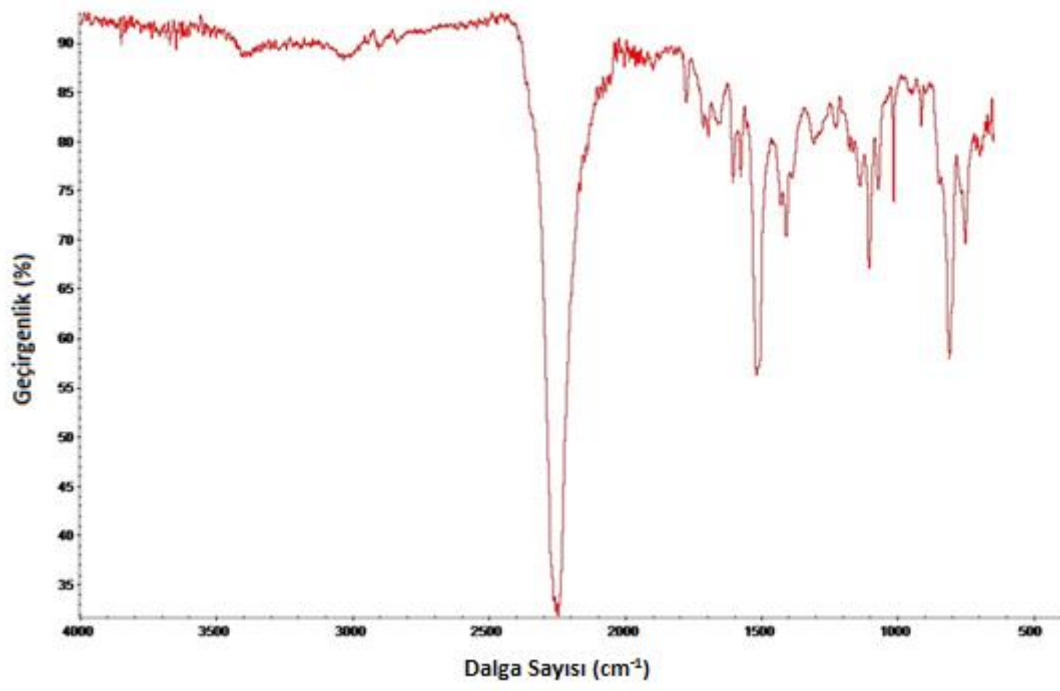
Kullanılan hammaddelere FTIR analizi yapılmasındaki amaç üründe oluşan pikleri daha rahat yorumlayabilmektir.

Aşağıdaki şekillerde β -TCP içermeyen ve ağırlıkça %20, %30 ve %40 oranlarında 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutunda β -TCP içeren doku iskelelerine ve kullanılan hammaddelere ait FTIR spektrumları verilmiştir.

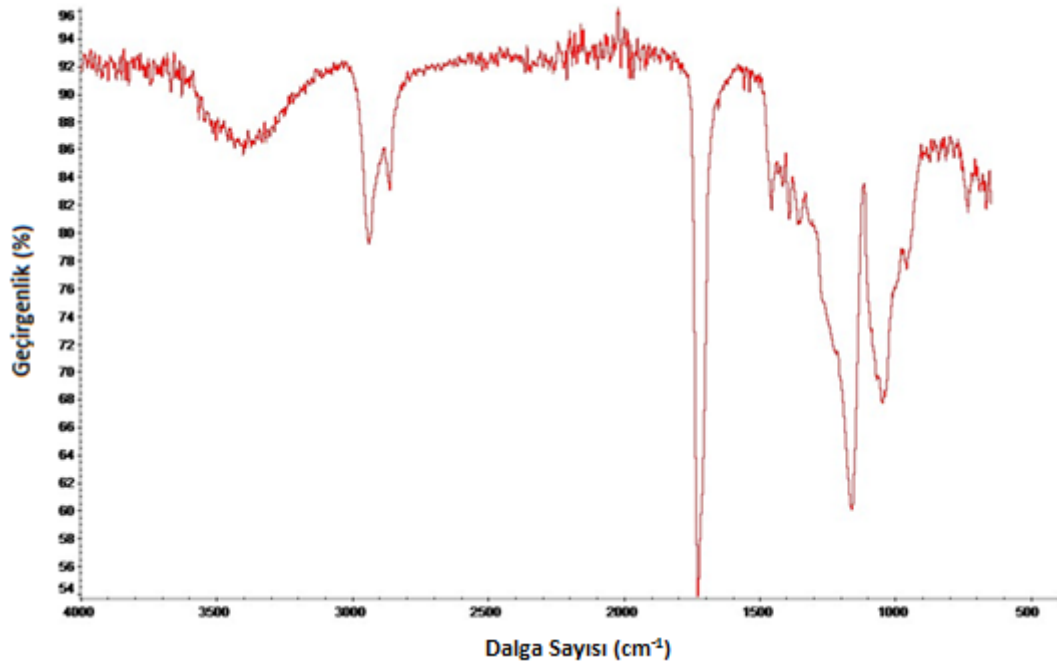
Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’ te elde edilen FTIR spektrumları karşılaştırıldığında gruplar arasında herhangi bir kimyasal farklılık görülmezken, elde edilen son üründe üreanın 1217 cm^{-1} ’ de, fosfatın ise 1060 cm^{-1} ’ de pik vermesi ve 2270 cm^{-1} ’deki karakteristik izosiyanat pikinin görülmemesi polimerizasyonun yüksek verimde gerçekleştiğinin ve istenilen malzemenin elde edildiğinin göstergesidir. FTIR spektrumlarında $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ bandı serbest -NH gruplarını göstermektedir. Burada görülen pikin zayıf bir pik olmasının sebebi elde edilen poliüretan yapısı içindeki -NH gruplarının neredeyse hepsinin hidrojen bağlı olduğunu göstermektedir.

$2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ bandı -CH_2 ve -CH gruplarının varlığının göstergesi iken, 1625 cm^{-1} ’ de poliüretan kimyasal yapısında bulunan amid gruplarındaki hidrojen bağlarına ait pikin görülmesi ve $1700\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ bandında üretan yapısında bulunan C=O gruplarına ait pikin görülmesi istenilen poliüretan yapısının sentezlendiğinin diğer göstergelerindendir. FTIR spekturumları karşılaştırıldığında gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

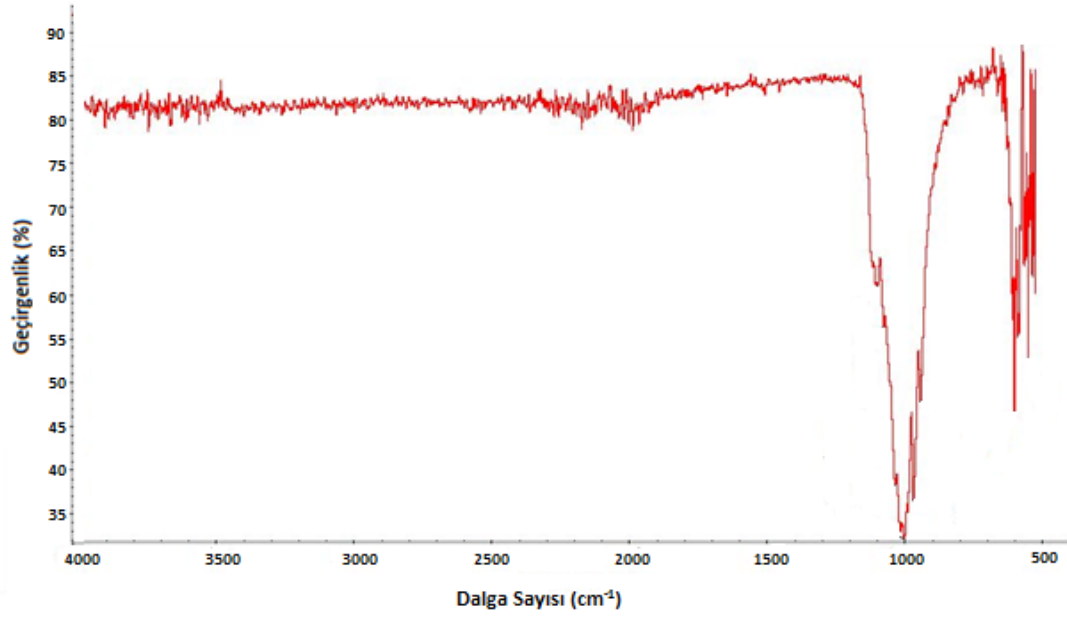
Pik noktaları değerlendirmeleri Çizelge 4.3’ te özetlenmiştir.



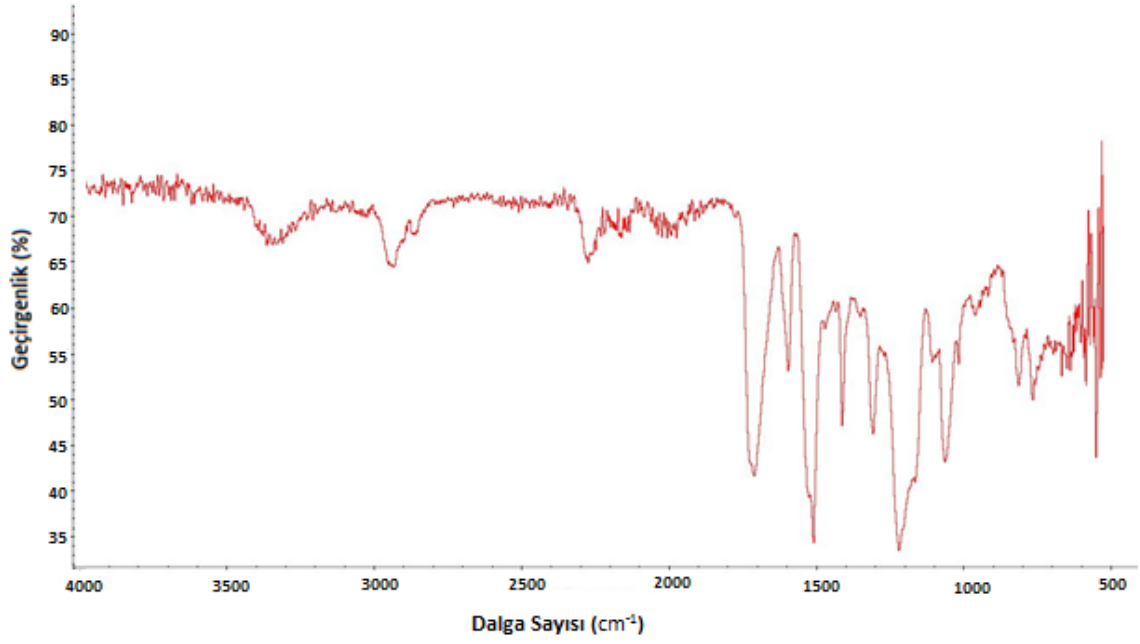
Şekil 4.9 Kullanılan pMDI hammaddesi için FTIR spektrumu



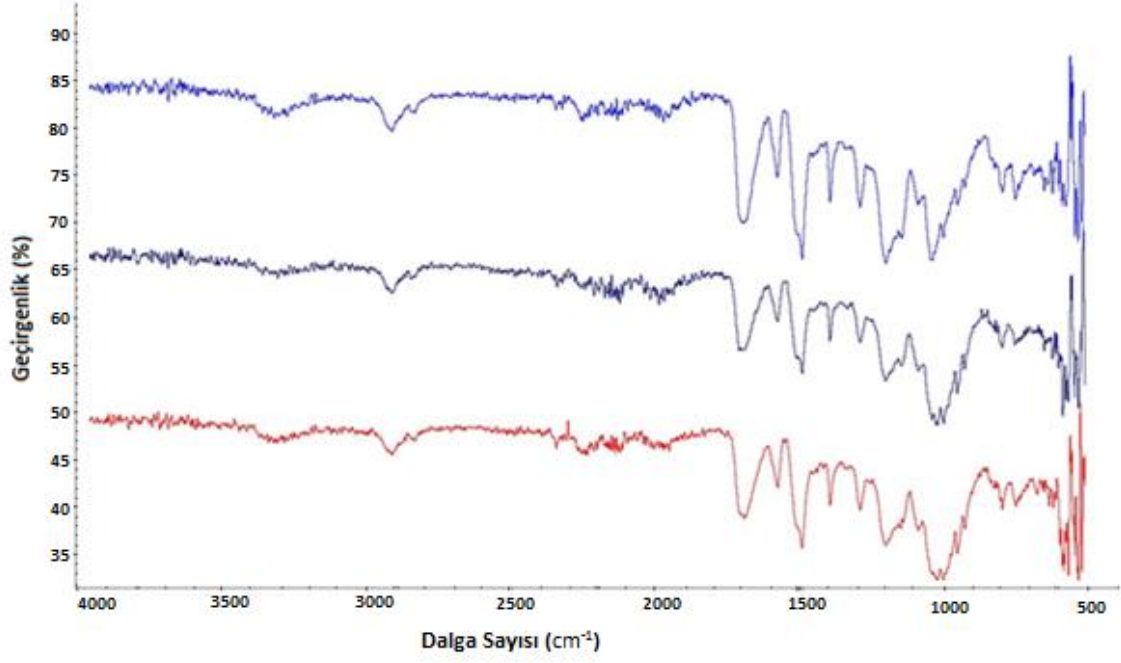
Şekil 4.10 Kullanılan kaprolakton monomerinin FTIR spektrumu



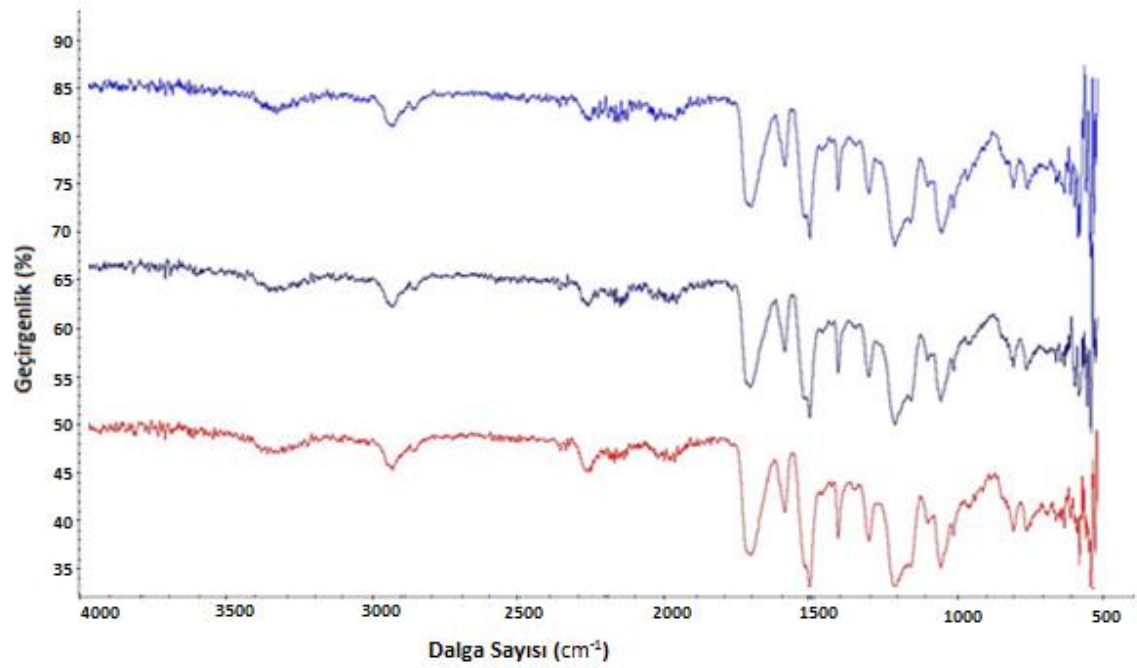
Şekil 4.11 β -TCP'ye ait FTIR spektrumu



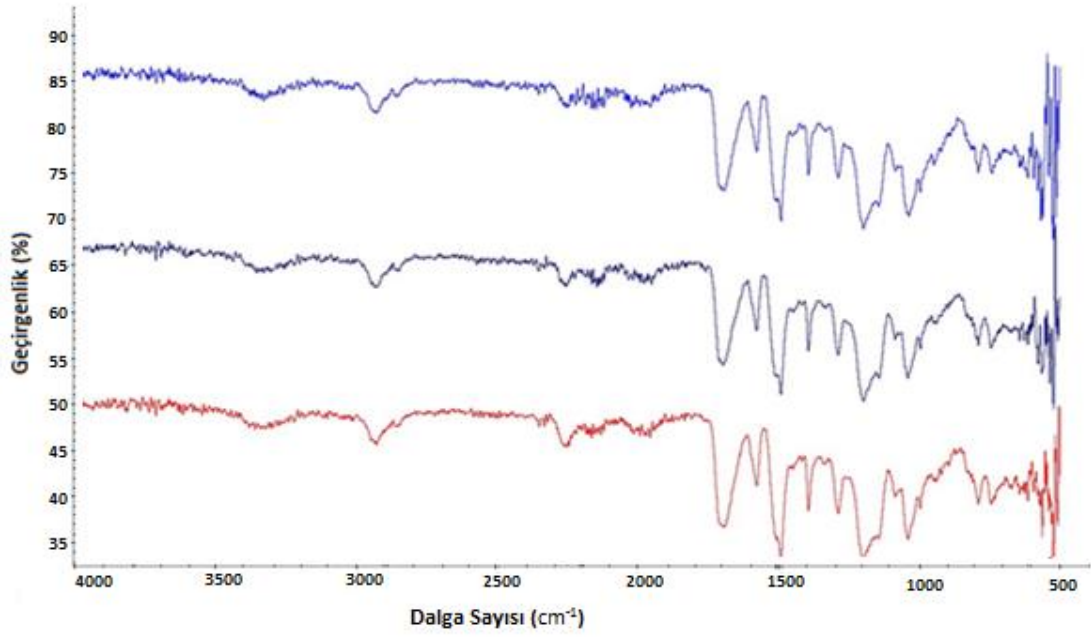
Şekil 4.12 β -TCP içermeyen poliüretan malzemeye ait FTIR spektrumu



Şekil 4.13 Ağırlıkça %20, %30 ve % 40 oranlarında 0,5-1 mm β -TCP içeren poliüretan tabanlı kompozit malzemeye ait FTIR spektrumu



Şekil 4.14 Ağırlıkça %20, %30 ve % 40 oranlarında 1-2 mm β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait FTIR spektrumu



Şekil 4.15 Ağırlıkça %20, %30 ve % 40 oranlarında 2-4 mm β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait FTIR spektrumu

Çizelge 4.3 Bileşiğin FTIR spektrumunda tayin edilen pikler

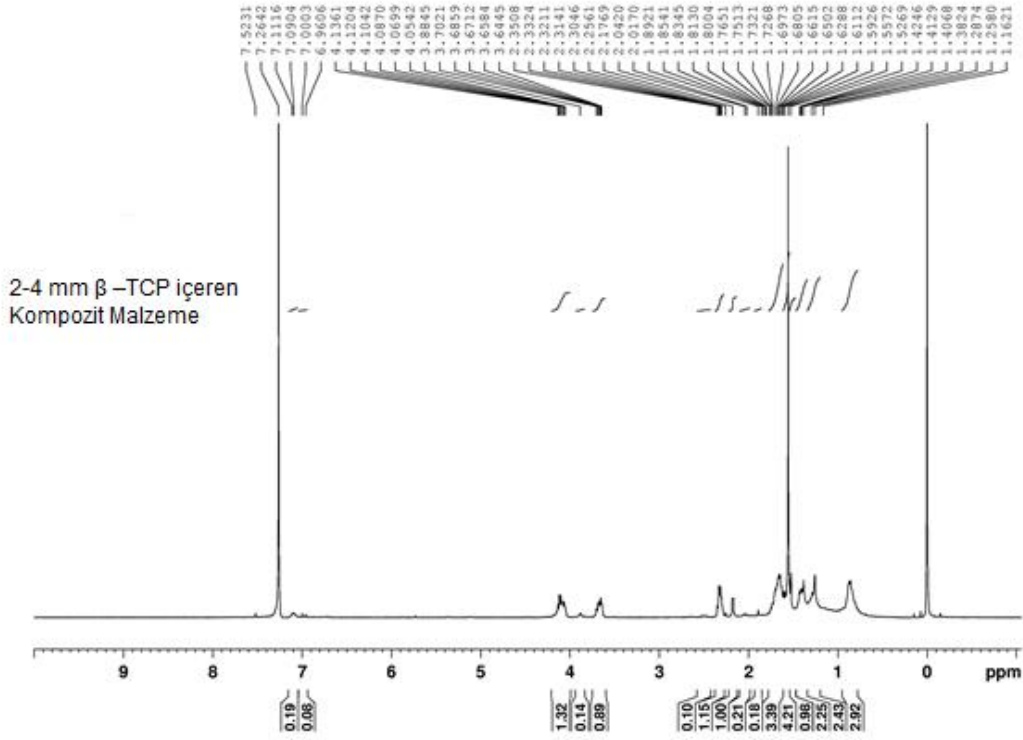
Dalga Boyu (cm ⁻¹)	Karakteristik Pik
1060	Fosfat
1217	Üretan
1530	-C-NH Düzlemsel Eğilmedeki Simetrisi
1625	Amid Grupları içindeki Hidrojen Bağları
1700-1740	Üretan içindeki karbonil grupları
2850	-CH ₂ Simetrik Titreşim
2860	-C-H Esnekliği
2931-2935	-CH ₂ Asimetrik Titreşim
2250-2270	İzosiyanat (görülmedi)
3300-3380	Serbest -NH Grupları

β -TCP içeren PU/ β -TCP kompozit yapılarının kimyasal yapı analizi için FTIR analizinin yanı sıra molekülde bulunan atom çekirdeklerinin kuvvetli bir manyetik alan içerisinde elektromanyetik ışınları absorblaması üzerine kurulmuş bir kimyasal yapı aydınlatma yöntemi olan ^1H -NMR tekniği kullanılmıştır. Analiz; %20, %30 ve %40 (a/a) oranlarında 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında β -TCP içeren PU/ β -TCP kompozit numunelere yapılmıştır.

Aşağıdaki şekillerde sırasıyla 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında β -TCP içeren PU/ β -TCP kompozit yapılarına ait ^1H -NMR spektrumları verilmiştir. Üç farklı gruba ait elde edilen ^1H -NMR spektrumları karşılaştırıldığında FTIR analizine benzer şekilde gruplar arasında herhangi bir kimyasal farklılık gözlenmemiştir.

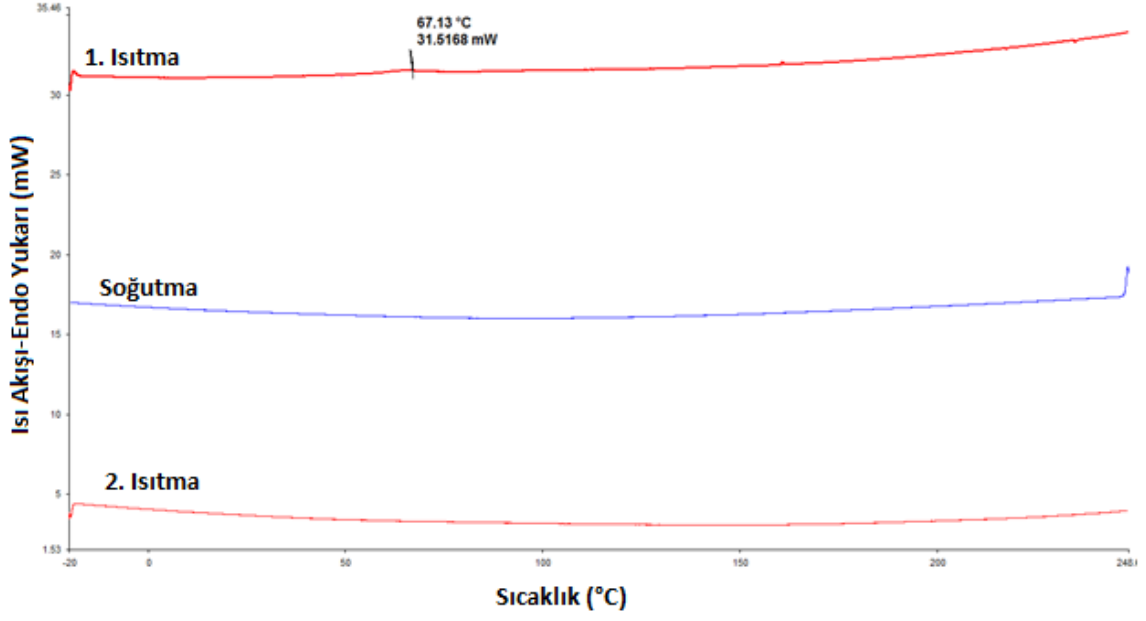
^1H -NMR spektrumları incelendiğinde iç referans (TMS) piki spektrumun en sağında tek ve keskin pik vermektedir ($\delta = 0,02$). Çözücü piki CHCl_3 ise spektrumun en solunda pik vermektedir ($\delta = 7,26$).

Şekil 4.14, 4.15 ve 4.16'da sırasıyla kimyasal kayma değerleri $\delta = 6,95$, $7,02$ ve $7,10$ olan pikler aromatik bir yapı düşündürmektedir. $\delta = 1,55$, $1,45$ ve $1,43$ noktalarında görülen piklerin aromatik yapının arasında kalan metilen grubuna ait kimyasal kaymanın değerleri olduğu, $\delta = 4,11$, $4,10$ ve $4,26$ noktalarında görülen kimyasal kaymaların aromatik amin grubuna ait protonlarının kimyasal kayması olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla elde edilen bu pik değerlerinin poliüretanın aromatik sert segment kısmına ait değerler olduğu sonucuna varılabilir. Poliol kısmının en dıştaki homolog metilen protonlarının kimyasal kaymasının $\delta = 3,70$, $3,67$ ve $3,68$ orta kısmında yer alan metilen protonlarının kimyasal kaymasının ise $\delta = 2,31$, $2,33$ ve $2,30$ olduğu öngörülmüştür. Bu pik değerlerinin poliüretanın yumuşak segment kısmına ait kimyasal kayma değerleri olduğu düşünülmektedir.

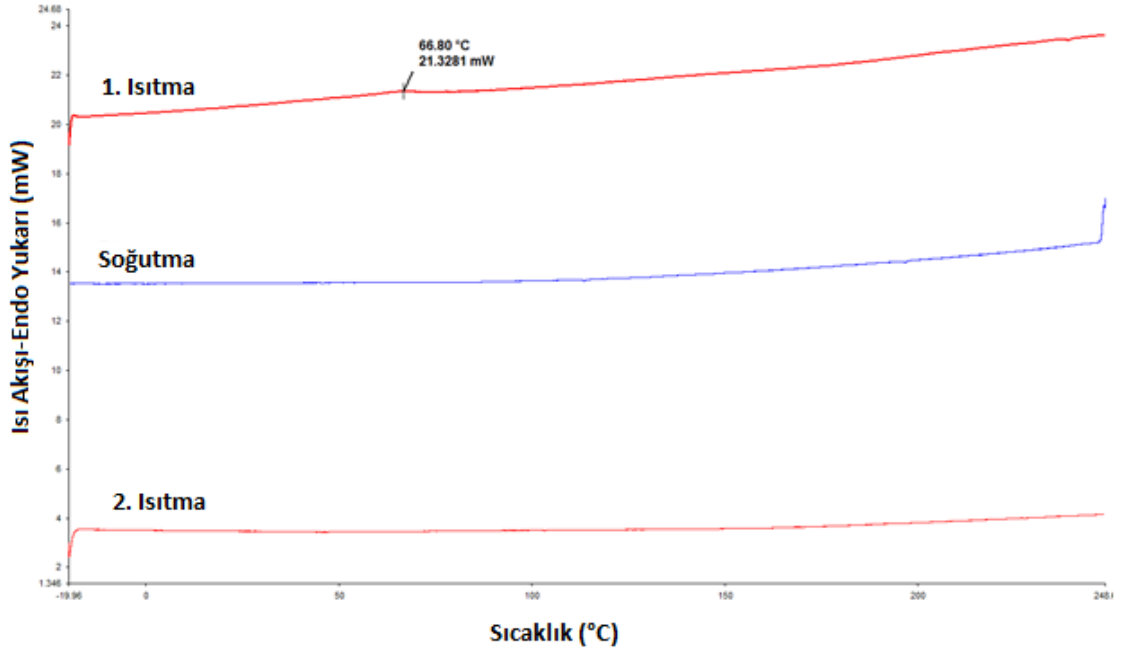


Şekil 4.18 2-4 mm β -TCP içeren kompozit malzemeye ait ^1H -NMR spektrumu

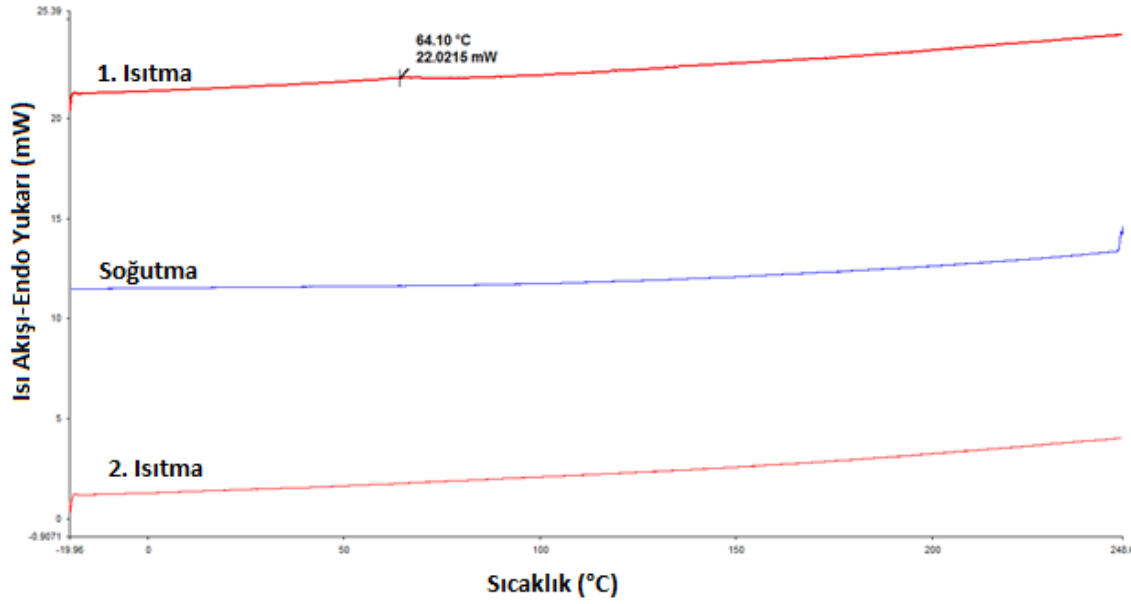
Poliüretan/seramik kompozit yapısının termal davranışını incelemek amacıyla DSC analizi yapılmıştır. Analiz için ağırlıkça %20, %30 ve %40 oranlarında 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm β -TCP içeren numuneler kullanılmıştır. Aşağıda verilen şekillerde farklı partikül boyutlarında β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemelere ait DSC diyagramları verilmiştir. DSC diyagramları incelendiğinde oranında 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm β -TCP içeren numunelere ait Tg sıcaklıkları sırasıyla 67,13 °C, 66,80 °C ve 64,10 °C olarak bulunmuştur. Analiz sonucu elde edilen DSC diyagramları incelendiğinde endotermik pikler elde edilmiş ve yalnızca tek bir camsı geçiş sıcaklığı Tg gözlenmiştir. Grafiklerde gözlenen Tg değerlerinin poliüretanın sert segment kısmına ait olduğu, soft segment kısmına ait Tg değerlerinin ise sert segmente ait Tg değerlerine göre çok küçük olması sebebiyle tespit edilemediği düşünülmektedir.



Şekil 4.19 0,5-1 mm β -TCP içeren malzemeye ait DSC Diyagramı



Şekil 4.20 1-2 mm β -TCP içeren malzemeye ait DSC Diyagramı



Şekil 4.21 2-4 mm β -TCP içeren malzemeye ait DSC Diyagramı

Tez kapsamında üretilen β -TCP içermeyen ve %20, %30 ve %40 (a/a) oranında 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında β -TCP içeren numunelerin mekanik mukavemetini belirlemek ve poliüretan yapısına β -TCP ilavesinin mekanik dayanıma olan etkisini belirlemek amacıyla basma testi yapılmıştır. Analiz 10 N'luk bir yük altında yükleme hızı 5 mm/dakika yükleme hızı ile gerçekleştirilmiştir. Basma testi 3 tekrarlı yapılmış ve elde edilen sonuçların aritmetik ortalaması alınmıştır. Elastik modül %7 - 10 deformasyon aralığında hesaplanmıştır.

β -TCP içermeyen, 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutunda ağırlıkça üç farklı oranda (%20, %30 ve %40) β -TCP içeren gruplara ait basma testi sonuçları Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de sırasıyla verilmiştir.

Çizelge 4.4 β -TCP içermeyen Poliüretan doku iskelesine ait basma analizi sonuçları

	E_{mod} (MPa)	0,2 % 'deki plastik deformasyon (N)	F_{max} (N)	F_{max}'taki dL miktarı (mm)	S₀ (mm²)
Poliüretan Malzeme	3,21	975,1411	5126,626	14,20602	596,754

Çizelge 4.5 0,5-1 mm partikül boyutunda ağırlıkça üç farklı oranda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelelerine ait basma analizi sonuçları

β-TCP Yüzdesi (0,5-1 mm)	Emod (MPa)	0,2 % 'deki plastik deformasyon (N)	F_{max} (N)	F_{max}'taki dL miktarı (mm)	S₀ (mm²)
%20	4,66	952,5049	1476,036	10,46268	531,885
%30	6,12	1734,853	5016,278	11,21029	525,683
%40	10,30	4609,593	8827,064	11,88098	660,126

Çizelge 4.6 1-2 mm partikül boyutunda ağırlıkça üç farklı oranda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelelerine ait basma analizi sonuçları

β-TCP Yüzdesi (1-2 mm)	Emod (MPa)	0,2 % 'deki plastik deformasyon (N)	F_{max} (N)	F_{max}'taki dL miktarı (mm)	S₀ (mm²)
%20	4,94	1645,901	6053,666	13,56014	492,532
%30	7,68	1821,508	6472,68	11,76535	544,978
%40	13,00	4527,066	7009,54	11,76762	686,416

Çizelge 4.7 2-4 mm partikül boyutunda ağırlıkça üç farklı oranda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelelerine ait basma analizi sonuçları

β-TCP Yüzdesi (2-4 mm)	E_{mod} (MPa)	0,2 % 'deki plastik deformasyon (N)	F_{max} (N)	F_{max}'taki dL miktarı (mm)	S₀ (mm²)
%20	7,37	1583,301	6773,573	12,35528	531,768
%30	6,99	1872,737	4501,697	13,32519	496,503
%40	6,13	1978,346	3564,96	12,53851	645,233

Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9' da farklı partikül boyutuna ve ağırlıkça farklı yüzdelere sahip doku iskelelerine ait elastik modül ve akma dayanımı değerleri verilmiştir. β -TCP ilavesinin mekanik dayanıma olan etkisini belirlemek amacıyla elde edilen elastik modül (E_{mod}) değerleri ve akma dayanımları karşılaştırıldığında en yüksek elastik modül değeri 1-2 mm partikül boyutunda ağırlıkça %40 oranında β -TCP içeren grupta gözlenirken, en yüksek akma dayanımına sahip gruplar 0,5-1 mm ve 1-2 mm %40 (a/a) oranında β -TCP içeren gruplar olmuştur.

Çizelge 4.8 Ağırlıkça üç farklı yüzde ve partikül boyutunda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelesine ait basma analizi sonuçları (Emod: elastik modül)

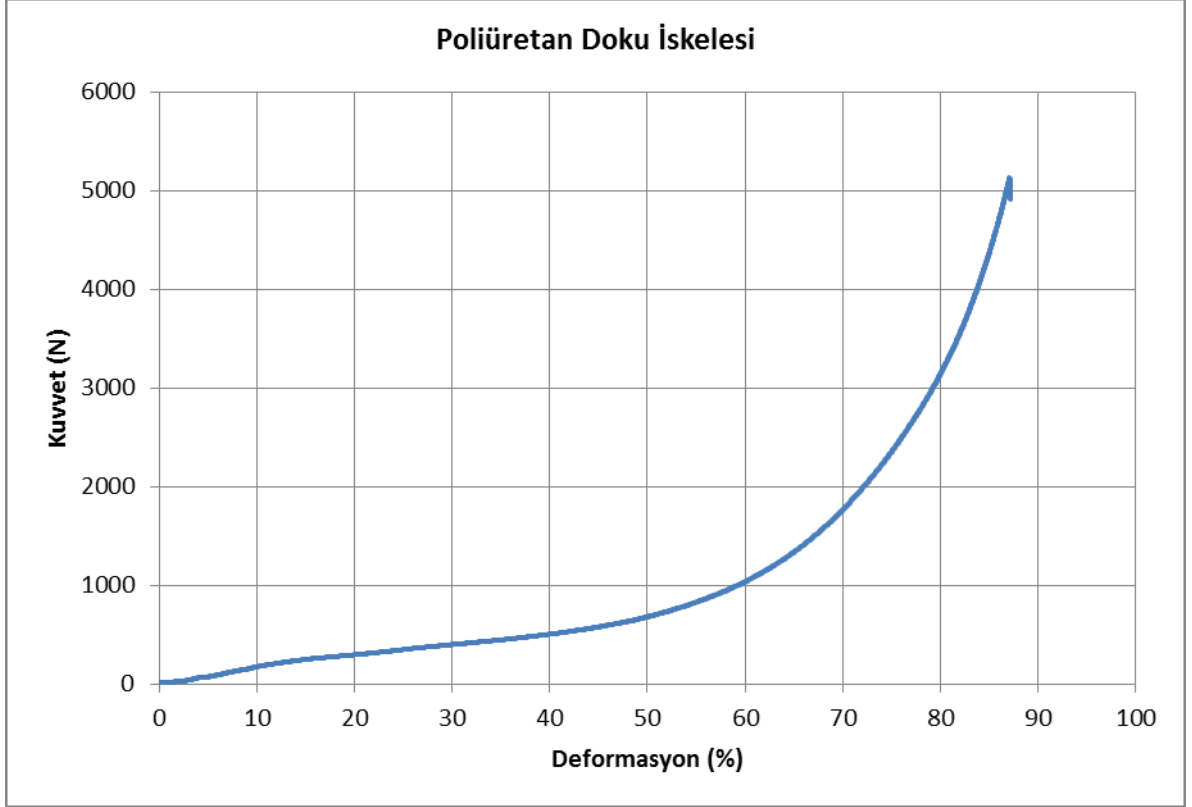
	Emod (MPa)		
β-TCP Boyutu/Yüzdesi	%20	%30	%40
0,5-1 mm	4,66	6,12	10,30
1-2 mm	4,94	7,68	13,00
2-4 mm	7,37	6,99	6,13

Çizelge 4.9 Ağırlıkça üç farklı yüzde ve partikül boyutunda β -TCP içeren Poliüretan doku iskelesine ait basma analizi sonuçları (0,2 %'deki plastik deformasyon (N))

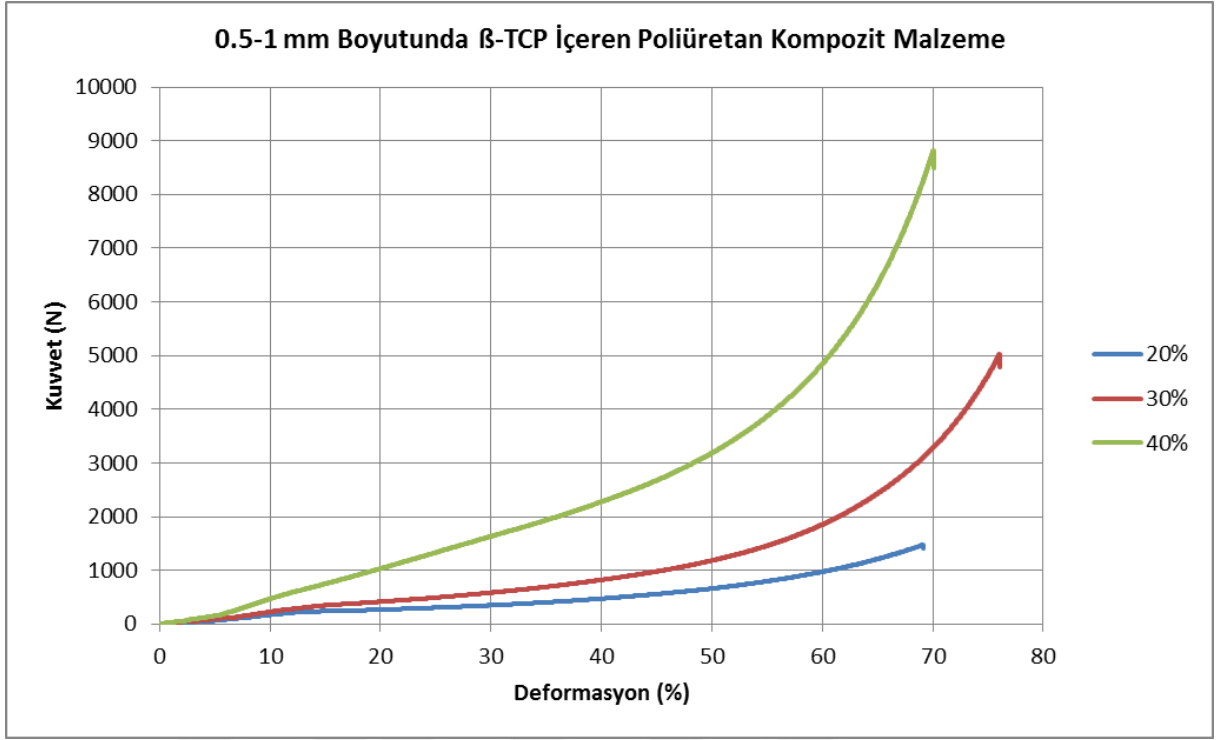
	0,2 %'deki plastik deformasyon (N)		
β-TCP Boyutu/Yüzdesi	%20	%30	%40
0,5-1 mm	952,5049	1734,853	4609,593
1-2 mm	1645,901	1821,508	4527,066
2-4 mm	1583,301	1872,737	1978,346

Aşağıda verilen şekillerde ise β -TCP içermeyen, 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutunda β -TCP içeren numunelerin basma analizi grafikleri verilmiş ve aynı partikül boyutuna sahip farklı yüzdelerde β -TCP içeren numunelerin içerdiği β -TCP yüzdesine göre karşılaştırmaları yapılmıştır. Grafikler incelendiğinde %40 (a/a) oranında β -TCP içeren grupların basma dayanımlarının daha yüksek olduğu, diğer bir ifadeyle β -TCP oranını arttırmanın numunelerin basma dayanımını arttırdığı sonucuna varılabilir.

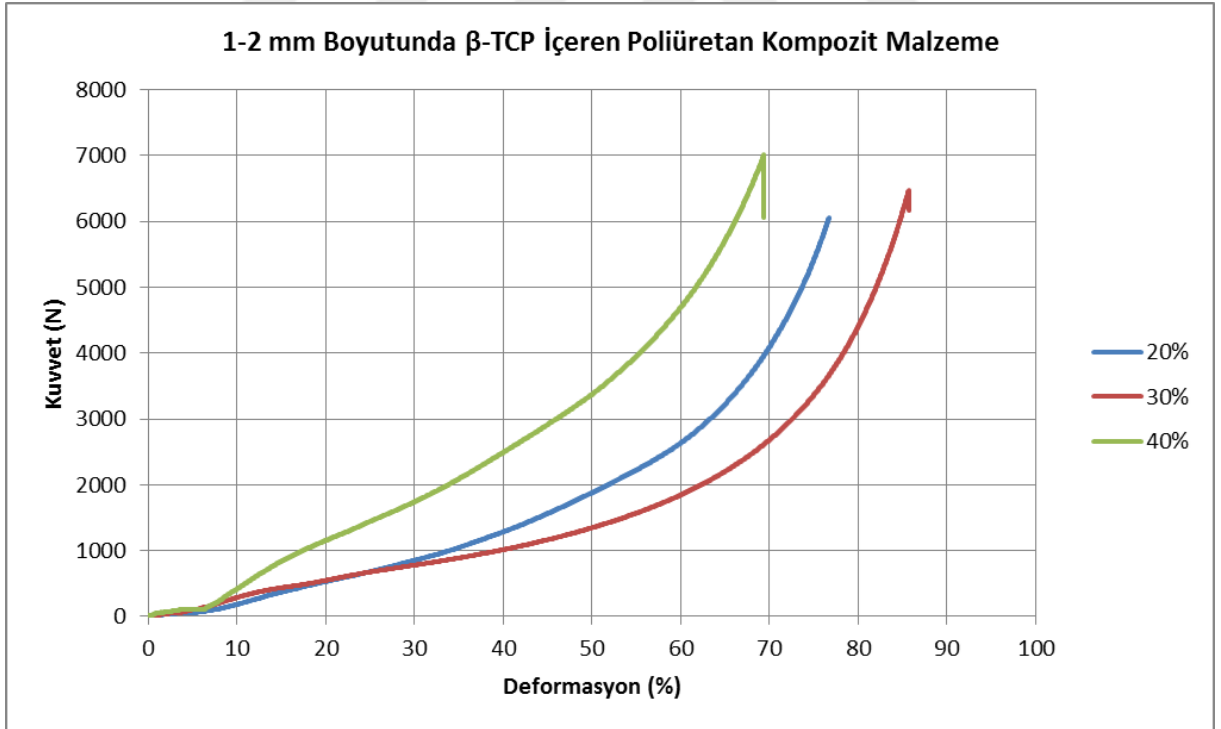
Şekil 4.26’ da ise %40 (a/a) oranında β -TCP içeren 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında β -TCP içeren numunelerin basma dayanımı karşılaştırılmıştır. Elde edilen grafik incelendiğinde ve Emod değerleri karşılaştırıldığında basma dayanımı en yüksek olan grup 1-2 mm partikül boyutunda %40 (a/a) oranında β -TCP içeren grup olurken, basma dayanımı en küçük olan grup ise 2-4 mm partikül boyutlarında β -TCP içeren grup olmuştur.



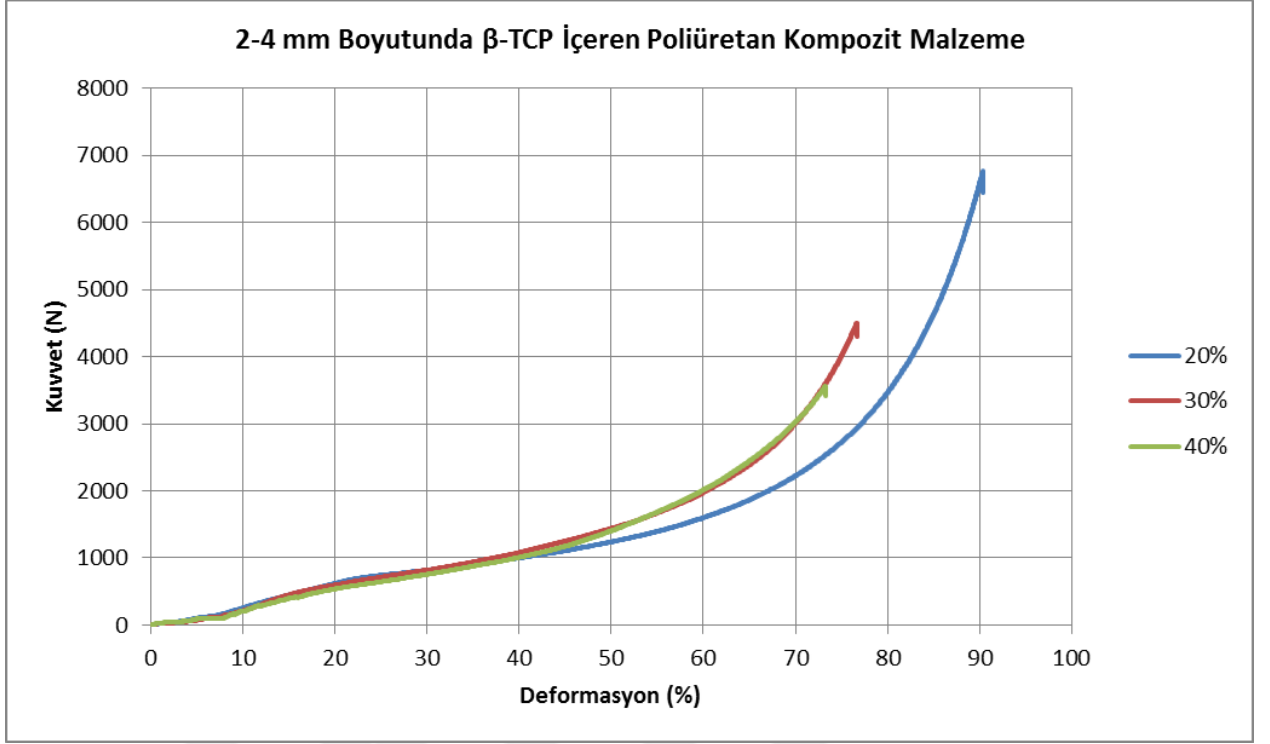
Şekil 4.22 β -TCP içermeyen poliüretan doku iskelesine ait basma analizi grafiği



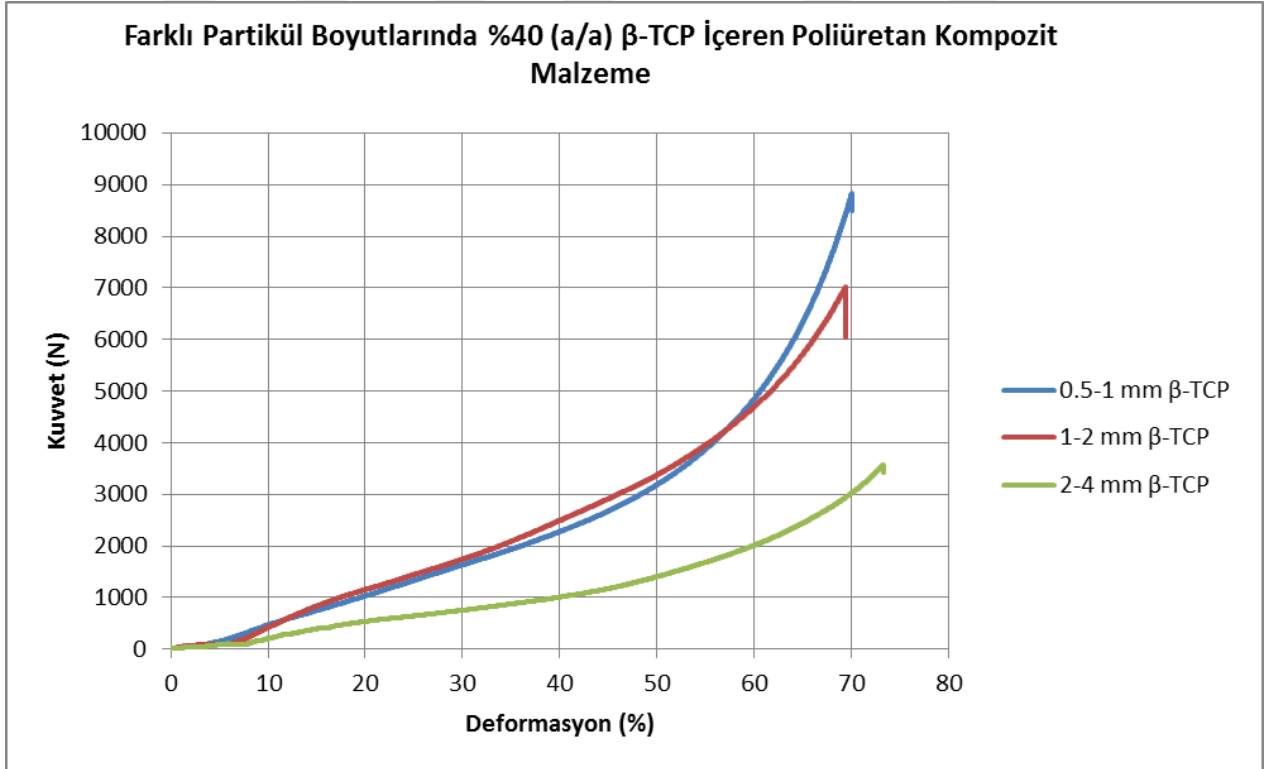
Şekil 4.23 0,5-1 mm boyutunda β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait karşılaştırmalı basma analizi grafiğı



Şekil 4.24 1-2 mm boyutunda β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait karşılaştırmalı basma analizi grafiğı



Şekil 4.25 2-4 mm boyutunda β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait karşılaştırmalı basma analizi grafiğı



Şekil 4.26 Farklı partikül boyutlarında ağırlıkça %40 oranında β -TCP içeren poliüretan kompozit malzemeye ait karşılaştırmalı basma analizi grafiğı

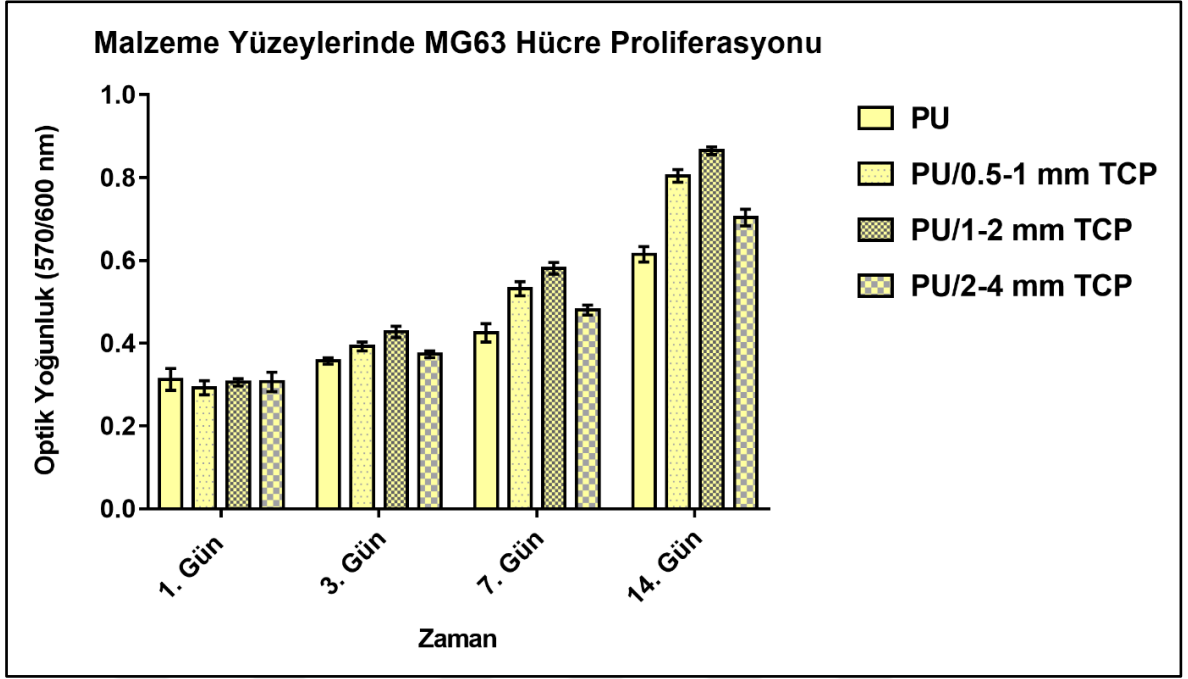
4.3 *In vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında üretilen farklı oranlarda β -TCP içeren malzemelerin kemik doku mühendisliğinde kullanım potansiyellerinin araştırılması amacıyla ikilenme süresi kısa ve dayanıklılığı yüksek MG63 osteosarkoma hücre hattı ile *in vitro* çalışmalar yürütülmüştür. Hücreler %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 Antibiyotik-Antimikotik içerikli düşük glikozlu DMEM besi ortamında kültüre edilmiştir.

In vitro çalışmalar için β -TCP içermeyen ve %20, %30 ve %40 (a/a) oranında ve farklı boyutlarda (0,5-1 mm, 1-2 mm, 2-4 mm) β -TCP içeren PU doku iskeleleri arasından farklı boyutlarda en yüksek β -TCP oranına sahip malzemeler seçilmiştir.

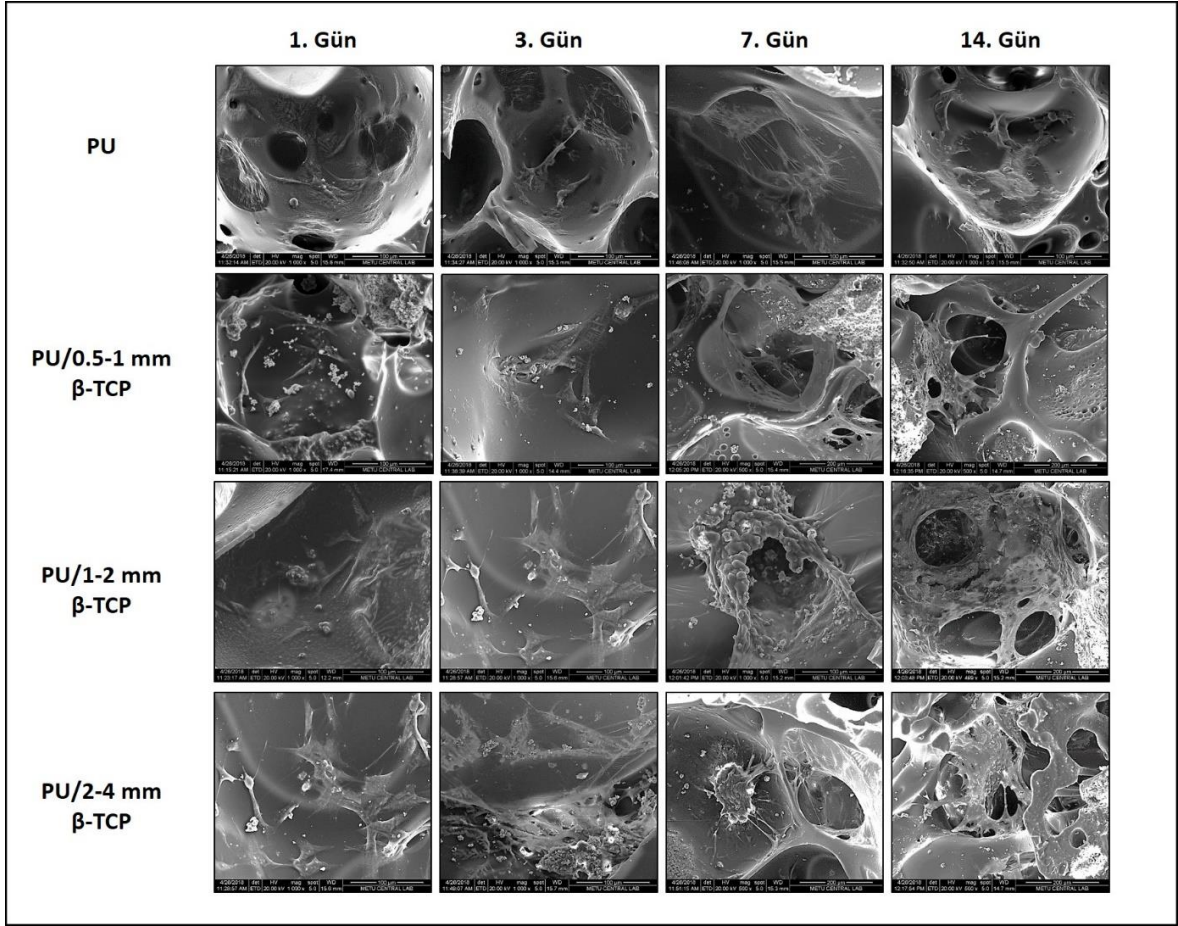
Hücre canlılığı ve proliferasyonunu tayin etmek amacıyla kültürün 1., 3., 7., ve 14. günlerinde Alamar Mavisi (ThermoFisher, Almanya) testi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen üreme grafiğine bakıldığında (Şekil 4.27), hücre ekiminden 24 saat sonra gerçekleştirilen canlılık analizi tüm malzemelere neredeyse eşit oranda hücre ekimi gerçekleştirildiğini doğrulamaktadır. Takiben, 3. günde gerçekleştirilen canlılık analizi sonucunda 1-2 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerinde en yüksek canlılığın görüldüğü dikkat çekmektedir. Yine aynı zaman noktasında 0,5-1 mm boyutlarında β -TCP içeren iskelelerdeki canlılık da 1-2 mm β -TCP içeren gruba yakın bulunmuştur. Kültürün 7. gününe gelindiğinde elde edilen canlılık değerleri içerisinde yine en yüksek olanı 1-2 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerine ait olduğu görülmektedir. 0,5-1 mm ve 1-2 mm boyutlarında β -TCP içeren yapılarda en yüksek canlılık değerleri kaydedilmiştir ve 1-2 mm β -TCP içeren doku iskeleleri kültür süresince hücre çoğalmasını destekleme yönündeki üstünlüğünü korumuştur.



Şekil 4.27 Farklı malzeme yüzeylerinde MG63 çoğalmasının zamana bağlı değişimi

Hücre çoğalması sonuçları elektron mikroskopi görüntüleriyle desteklenmiştir. Şekil 4.28’de paylaşılan zamana bağlı malzeme yüzeyindeki hücre davranışları Alamar mavisi sonuçlarıyla büyük uyumluluk göstermektedir. Elektron mikroskobisi görüntülerinde kültürün ilk gününde hücrelerin birbirleri ve malzeme ile kurmuş oldukları ilişkiler oldukça benzerlik göstermektedir. Hücreler bu aşamada henüz malzemeyi ve içerisinde bulunduğu mikro çevreyi tanıma aşamasındadır. Kültürün 3. gününden itibaren 1-2 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerinin gözeneklerinde hücreler geniş bir yayılım göstermeye başlamıştır ve diğer tüm zaman noktalarında da 1-2 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskeleleri diğer malzemelere göre üstünlük göstermektedir. Özellikle kültürün son günü olan 14. gün sonuçlarına bakıldığında hücreler iskele yüzeyindeki gözeneklerin neredeyse tamamını kapatacak kadar yayılım göstermişlerdir.



Şekil 4.28 Farklı malzeme yüzeylerinde MG63 hücre davranışlarının zamana bağlı değişiminin taramalı elektron mikroskopisi yardımıyla görüntülenmesi

Kütlece aynı oranda β -TCP içeren PU doku iskelelerinde hücre üremesinin ve hücre davranışların farklılık göstermesinin β -TCP'nin parçacık boyut dağılımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Malzeme karakterizasyonu kısmında paylaşılan verileri yeniden değerlendirdiğimizde; elde edilen malzemelerin elektron mikroskopisi bulguları karşılaştırıldığında, β -TCP'nin parçacık boyutu arttıkça malzeme içerisindeki gözenekler boyutsal açıdan heterojenite göstermeye başlamaktadır. Başka bir deyişle, büyük boyutlu TCP kullanımı gözenek boyut dağılımını yüksek oranda etkileyerek birbirinden farklı boyutlarda gözeneklerin oluşmasına sebep olmakta ve bu durumun gözeneklerin birbiri ile bağlılık durumunu olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Bu durum hücrelerin ekim sırasında malzeme yüzeyinde düzgün dağıtılamamasına sebebiyet vermektedir ve dolayısıyla kültürün ileri aşamalarında hücre göçünün engellenmesi, alan kısıtlamasına bağlı olarak hücrelerin apoptoza sürüklenmesi, besin transportunun sekteye uğraması gibi durumların oluşmasına sebebiyet vermektedir. 1-2 mm ve 0,5-1 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerinin

gözenek boyutlarının diğer malzemelere kıyasla nispeten daha yakın olduğu ve gözeneklerinin açık yapıda olduğu düşünülmektedir. Hiç β -TCP içermeyen gruplarda ise gözeneklerin daha kapalı yapıda ve daha küçük çaplı olduğu düşünülmektedir ve buna bağlı olarak da hücre üremesinin kısıtlanması hem besin hem de alan yetersizliğine bağlanmıştır. Dolayısıyla malzemelerin ileriki çalışmalar için kullanım potansiyeli sınırlı bulunmuştur. Ayrıca, osteokondüktif bir malzeme olan β -TCP'nin kemik hücreleri üzerindeki hücre çoğalmasını tetikleyici etkisi unutulmamalıdır. Buna bağlı olarak β -TCP içeren gruplarda daha yüksek canlılığa rastlanması kaçınılmazdır.

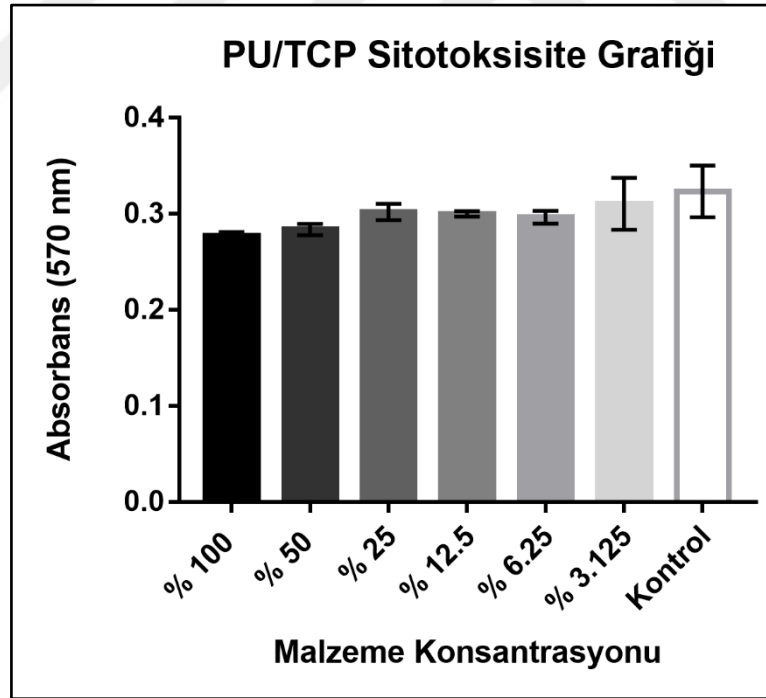
In vitro çalışmaların genel sonuçlarına bakıldığında %40 (a/a) β -TCP ilavesinin tüm PU yapılarında hücre çoğalmasını, göçünü ve metabolizmasını pozitif yönde etkilediği görülmektedir. Ancak çalışma kapsamında elde edilen bulgulara dayanarak, β -TCP boyutlarının nihai malzemenin başarısına etki ettiği ve bunu yüksek oranda gözenek boyutu ve dağılımını etkileyerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

%40 oranında (a/a) 1-2 mm boyutunda β -TCP içeren PU doku iskelelerine sitotoksitesite testi L929 fare fibroblast hücreleri (NCTC clone 929, ATTC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pasaj 34 halinde sıvı azot ortamında saklanan hücreler hızlı bir şekilde 37 °C'de çözülüp %10 FBS (Capricorn), %1 Antibiyotik (Capricorn) ve %1 L-glutamin içeren yüksek glikozlu DMEM (Capricorn) besiyerinde, 75 cm²'lik flasklar içinde, 37 °C'de, %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Belirli bir üreme yoğunluğuna ulaşan hücreler pasajlanarak 24 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Sitotoksitesite analizi ISO 10993-2 standardı gereğince elüsyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Test edilecek malzemeler öncelikle % 70 alkol ile 2 saat boyunca steril edilmiştir. Takiben; ekstraksiyon besiyeri hazırlamak için 0,8 gr malzeme 4 mL serumsuz, antibiyotiksiz besi ortamına eklenmiştir ve 37 °C'de, karbondioksit etüvünde 24 saat boyunca bekletilmiştir. Filtre edilen ekstraksiyon besiyeri ortamına yukarıda bahsi geçen oranlarda serum, antibiyotik ve L-glutamin katkısı sağlanarak 24 saat kültüre edilmiş 24 kuyucuklu kültür kabındaki hücreler ile etkileştirilmiştir ve hücreler 24 saat daha kültüre edilmişlerdir. Çalışma kapsamında ekstraksiyon besiyerinin seyreltilmesiyle farklı derişimler hazırlanmıştır ve sitotoksitesite analizi malzeme yoğunluğuna bağlı olarak gerçekleştirilmiştir.

24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besi ortamı atılıp, 600 µL serumsuz, antibiyotiksiz besi ortamı ve 60 µL MTT (5 mg/mL) ilave edilmiştir ve 4 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Süre bitiminde besi ortamı uzaklaştırılan kuyucuklara, oluşmuş formazan kristallerini çözmek amaçlı 200 µL DMSO ilave edilmiştir. Takiben, her bir kuyucuktan 100 µL örneklem alınıp 96 kuyucuklu kültür kaplarında 570 nm absorbans değerinde okutulmuştur (BioTek, Amerika). Sonuçlar; derişime bağılı elde edilen absorbans değeri olarak grafiğe aktarılmıştır.

Çalışma sonunda kontrol grubunda bulunan hücrelerin absorbans değeri $0,323 \pm 0,027$ olarak kaydedilmişken, %100 konsantrasyonda $0,277 \pm 0,004$ olarak kaydedilmiştir. En yüksek malzeme konsantrasyonuna sahip besi ortamında inkübe edilmiş hücrelerde, kontrol grubu %100 kabul edildiğinde, %85,75 canlılık gözlenmiştir. ISO-10993 standardına göre, hücre canlılığı %70'in altında bulunduğunda malzemeler toksik olarak nitelendirilebilir. Bu tez çalışması kapsamında görülen yaklaşık %86 hücre canlılığı üretilen malzemelerin toksik olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.29 Çalışma kapsamında üretilen PU/1-2 mm β-TCP (%40 a/a) doku iskelelerinin doz bağımlı sitotoksosite grafiği

5 SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Yük taşıma potansiyeli nedeniyle, poliüretandan hazırlanan doku iskeleleri sert doku onarımı için büyük önem taşımaktadır. Bu polimerler yumuşak ve sert segmentlerden oluşurlar. Sert segmentler diizosiyanatlardan oluşurken, poliüretan yapısının yumuşak segment kısmını genellikle diollar oluşturur. Sentezlenecek olan polimerin mekanik özellikleri de dahil olmak üzere birtakım özellikler, stokiyometrik hesaplamalar yoluyla nihai formülasyonu belirlemek amacıyla değiştirilebilir. Su, NCO ve diol gruplarının tepkimesi sonucu ortaya çıkan CO₂ miktarı ile gözenek oluşumu kontrol edilebilir [65]. Bu çalışmada, stokiyometrik oranlar istenilen gözenekli yapı ve mekanik dayanım göz önüne alınarak belirlenmiş ve poliüretan yapısına farklı partikül boyu (0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4mm) ve farklı yüzdelerde (%20, %30 ve %40 (a/a)) β -TCP partikülleri eklenerek oluşturulan kompozit doku iskelelerinin istenilen özellikleri karşılama durumu ve β -TCP boyutunun ve yüzdesinin bu özelliklere etkisi incelenmiştir.
- μ -CT analizi sonucunda toplam gözeneklilik ve açık gözeneklilik yüzdeleri sırasıyla β -TCP içermeyen poliüretan doku iskelesinde %71,19 ve %71,19, 0,5-1mm boyutunda β -TCP partikülleri içeren doku iskelesi için %94,05 ve %94,03, 1-2mm boyutunda β -TCP partikülleri içeren doku iskelesi için %96,20 ve %95,75, 2-4 mm boyutunda β -TCP partikülleri içeren doku iskelesi için ise %90,88 ve %90,85 olarak bulunmuştur. Bu oranlar, gözeneklilik oranı ortalama %50-90 arasında değişen trabeküler kemiğin gözenek oranının üst sınırındadır [66]. Ayrıca elde edilen oranlar, benzer bir çalışmada araştırılan ve yaklaşık% 46'lık bir oranla verilen bir PU/hidroksiapatit gözenekli yapııştırıcı tarafından elde edilen gözeneklilik derecesinin ve yine benzer bir çalışmada %30 (a/a) oranında nano-hidroksiapatit içeren ve gözenek oranı %80 olarak verilen poliüretan köpük yapısının ve bir diğer çalışma ile geliştirilen Bioglass® içeren ve gözenek oranı %70 civarında verilen biyobozunur poliüretan kompozit doku iskelesinin gözeneklilik derecesinin üstündedir [67-69].

- μ -CT analizi sonuçları poliüretan/ β -TCP doku iskelelerinin gözeneklerinin tamamen açık ve birbiriyle bağlantılı bir yapıya sahip olduğunu, β -TCP partiküllerinin yapı içindeki homojen dağılımını göstermektedir.
- μ -CT analizi sonuçlarında elde edilen toplam gözenek ve açık gözenek yüzdeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında poliüretan yapısına β -TCP eklenmesinin toplam gözenek miktarını önemli ölçüde arttırdığı, β -TCP boyutunun ve yüzdesinin artmasının da gözenek miktarını arttırdığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada geliştirilen maddelerin gözenekli yapısı gözenek oluşumu için gereken suyun stokiometrik hesaplamalarına bağlanabilir.
- SEM analizi sonuçları incelendiğinde poliüretan/ β -TCP doku iskelelerinin μ -CT sonuçları ile uyumlu olarak oldukça gözenekli ve bu gözeneklerin açık yapıya sahip olduğu, β -TCP partiküllerinin oldukça homojen bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. İnorganik ve organik faz birbiri ile entegre olmuş durumda gözlenmiştir. SEM görüntüleri ile yapının morfolojisinin doku iskelesi olarak kullanıma uygun olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca elde edilen doku iskelelerinin morfolojik yapısı benzer çalışmalarda geliştirilen poliüretan köpük kompozit yapılarının tipik morfolojik yapısı ile de tutarlılık göstermektedir [68-70].
- Hazırlanan doku iskelelerinin kimyası ve içeriğindeki safsızlıkların tayini için yapılan FTIR analizi sonuçlarına göre; son üründe üretanın 1217 cm^{-1} , fosfatın ise 1060 cm^{-1} de pik vermesi, diizosiyanat ve kaprolakton monomerine özgü piklere rastlanmaması polimerizasyonun yüksek verimde gerçekleştiğinin ve istenilen malzemenin elde edildiğinin göstergesidir. FTIR spektrumlarında $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ bandı --NH , $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ bandı --CH_2 ve --CH gruplarının varlığının göstergesidir. 1625 cm^{-1} de poliüretan kimyasal yapısında bulunan amid gruplarındaki hidrojen bağlarına ait pikin görülmesi ve $1700\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ bandında --üretan yapısında bulunan C=O gruplarına ait pikin görülmesi istenilen poliüretan yapısının sentezlendiğinin diğer göstergelerindendir. Elde edilen pik değerleri literatür ile karşılaştırılmış ve tutarlı bulunmuştur [70-72].

- 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında β -TCP içeren Poliüretan/ β -TCP kompozit yapılarına ait ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde sırasıyla kimyasal kayma değerleri $\delta = 6,95, 7,02$ ve $7,10$ olan pikler aromatik bir yapı düşündürmektedir. $\delta = 1,55, 1,45$ ve $1,43$ noktalarında görülen piklerin aromatik yapının arasında kalan metilen grubuna ait kimyasal kaymanın değerleri olduğu, $\delta = 4,11, 4,10$ ve $4,26$ noktalarında görülen kimyasal kaymaların aromatik amin grubuna ait protonlarının kimyasal kayması olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla elde edilen bu pik değerlerinin poliüretanın aromatik sert segment kısmına ait değerler olduğu sonucuna varılabilir. Poliol kısmının en dıştaki homolog metilen protonlarının kimyasal kaymasının $\delta = 3,70, 3,67$ ve $3,68$ orta kısmında yer alan metilen protonlarının kimyasal kaymasının ise $\delta = 2,31, 2,33$ ve $2,30$ olduğu öngörülmüştür. Bu pik değerlerinin poliüretanın yumuşak segment kısmına ait kimyasal kayma değerleri olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bu kayma değerleri literatürde yer alan değerlerle karşılaştırılmış ve tutarlı bulunmuştur [73].
- Poliüretan/seramik kompozit yapılarının termal davranışını incelemek amacıyla yapılan DSC analizi sonucunda 0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm partikül boyutlarında β -TCP içeren Poliüretan/ β -TCP kompozit doku iskelelerinin Tg değerleri sırasıyla $67,13^\circ\text{C}$, $66,80^\circ\text{C}$ ve $64,10^\circ\text{C}$ olarak bulunmuştur. Analiz sonucu elde edilen DSC diyagramları incelendiğinde endotermik pikler elde edilmiş ve yalnızca tek bir camısı geçiş sıcaklığı Tg gözlenmiştir. Grafiklerde gözlenen Tg değerlerinin poliüretanın sert segment kısmına ait olduğu, yumuşak segment kısmına ait değer ise sert segmente ait camısı geçiş sıcaklığına göre çok küçük olması sebebiyle tespit edilemediği düşünülmektedir. Elde edilen bu değerler sentezlenen poliüretan yapısına bağlı olarak sert segment kısmına ait camısı geçiş sıcaklığı genel olarak $30-110^\circ\text{C}$, yumuşak segment kısmına ait camısı geçiş sıcaklığı ise $(-80^\circ\text{C})-(-50^\circ\text{C})$ aralığında verilen literatürde verilen değerler ile de tutarlılık göstermektedir [74].
- Poliüretan tabanlı doku iskelesi adaylarının mekanik dayanımını belirlemek amacıyla yapılan basma testi sonuçları incelendiğinde elde edilen elastik modülüs değerleri $3,21-13$ MPa aralığında bulunmuştur. Elde edilen bu değerler benzer bir çalışmada araştırılan ve elastik modülüs değeri 271 kPa olarak verilen PU/hidroksiapatit gözenekli doku iskelesine ait elastik modülüs değerinin ve bir

diğer benzer çalışmada geliştirilen ağırlıkça farklı yüzdelerde flor/hidroksiapatit içeren ve elastik modülüs değerleri 270-780 kPa aralığında verilen poliüretan nanokompozit doku iskelelerinin elastik modülüs değerlerinin çok üstündedir [68,75]. Yine bu değerler basma dayanımı ve elastik modül değerleri sırasıyla 20-400 kPa ve 10-2000 kPa olarak verilen ticari poliüretan köpük kemik ikame maddelerine ait basma dayanımı değerlerinin de oldukça üstünde bulunmuştur [76]. Ancak bu değerler elastik modülüs değeri 50-100 MPa arasında değişen insan trabeküler kemiğinin elastik modülüs değerlerinin altındadır [71]. Doku iskelelerinin mekanik dayanımının kemiğin elastik modülüs değerlerine kıyasla daha az olmasının doku iskelelerinin yüksek gözenekli yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

- Ağırlıkça %20, %30 ve %40 oranında ve farklı boyutlarda (0,5-1 mm, 1-2 mm, 2-4 mm) β -TCP içeren PU doku iskelelerine yapılan basma testleri sonucu elde edilen elastik modülüs değerleri karşılaştırıldığında elastik modülüs değeri en yüksek olan grubun 1-2 mm partikül boyutunda %40 oranında β -TCP içeren grup olduğu görülmüştür. Ayrıca doku iskelelerine ait akma dayanımları karşılaştırıldığında 0,5-1 mm ve 1-2 mm % 40 oranında β -TCP içeren doku iskelelerinin en yüksek akma dayanımına sahip olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu değerler β -TCP oranını artırmanın malzemenin mekanik dayanımını arttırdığını gösterirken en yüksek β -TCP boyutunun (2-4 mm) malzemenin kırılabilirliğini artırarak mekanik özellikleri olumsuz etkilediğini göstermektedir. Elde edilen bu sonuç literatürde benzer bir çalışmada geliştirilen ve %5, %10 ve %20 (a/a) oranlarında flor/hidroksiapatit partikülleri içeren poliüretan nanokompozit doku iskelelerinin içerdiği flor/hidroksiapatit partikül oranı arttıkça basma dayanımının arttığı sonucuna varılan çalışma ile de benzer bir sonuç vermiştir [75].
- Poliüretan kemik yapıştırıcısının kemiğe yapışma mukavemetini belirlemek amacıyla yapılan çekme testi sonucu yapıştırıcının çekme dayanımı 1,34 MPa bulunmuştur. Elde edilen bu değer benzer bir çalışmada geliştirilen poliüretan tabanlı hidroksiapatit içeren nanokompozit ve hidroksiapatit içermeyen poliüretan kemik yapıştırıcıları için sırasıyla 0,60 ve 0,80 MPa olarak verilen çekme dayanımlarının üstündedir [77]. Ayrıca bu değer ticari ürün olarak kullanılan bir ürün

olan ve çekme dayanımı 0,40-0,60 MPa aralığında verilen Kryptonite® isimli ürüne ait çekme dayanımının da üstündedir [79].

- Ağırlıkça %20, %30 ve %40 oranında ve farklı boyutlarda (0,5-1 mm, 1-2 mm, 2-4 mm) β -TCP içeren PU doku iskeleleri arasından farklı boyutlarda en yüksek β -TCP oranına sahip malzemeler seçilerek *in vitro* ortamda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında doku iskelelerine MG63 osteosarkoma hücre hattı ekilerek Alamar Mavisi yöntemi ile kültürün 1., 3., 7., ve 14. günlerinde hücre canlılığı ve proliferasyonu tayin edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen üreme grafiği incelendiğinde, hücre ekiminden 24 saat sonra gerçekleştirilen canlılık analizi tüm malzemelere neredeyse eşit oranda hücre ekimi gerçekleştirildiğini doğrulamıştır. Takiben, 3. günde gerçekleştirilen canlılık analizi sonucunda 1-2 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerinde en yüksek canlılığı görülmüştür. Yine aynı zaman noktasında 0,5-1 mm boyutlarında β -TCP içeren iskelelerdeki canlılık da 1-2 mm β -TCP içeren gruba yakın bulunmuştur. Kültürün 7. gününe gelindiğinde elde edilen canlılık değerleri içerisinde yine en yüksek olanı 1-2 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerine ait olduğu görülmektedir. 0,5-1 mm ve 1-2 mm boyutlarında β -TCP içeren yapılarda en yüksek canlılık değerleri kaydedilmiştir ve 1-2 mm β -TCP içeren doku iskeleleri kültür süresince hücre çoğalmasını destekleme yönündeki üstünlüğünü korumuştur.
- Kütlece aynı oranda β -TCP içeren PU doku iskelelerinde hücre üremesinin ve hücresel davranışların farklılık göstermesinin β -TCP'nin parçacık boyut dağılımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Malzeme karakterizasyonu kısmında paylaşılan verileri değerlendirdiğimizde; elde edilen malzemelerin elektron mikroskopisi bulguları karşılaştırıldığında, β -TCP'nin parçacık boyutu arttıkça malzeme içerisindeki gözenekler boyutsal açıdan heterojenite göstermeye başlamaktadır. Başka bir deyişle, büyük boyutlu TCP kullanımı gözenek boyut dağılımını yüksek oranda etkileyerek birbirinden farklı boyutlarda gözeneklerin oluşmasına sebep olmakta ve bu durumun gözeneklerin birbiri ile bağlılık durumunu olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Bu durum hücrelerin ekim sırasında malzeme yüzeyinde düzgün dağıtılamamasına sebebiyet vermektedir ve dolayısıyla kültürün ileri aşamalarında hücre göçünün engellenmesi, alan kısıtlamasına bağlı olarak

hücrelerin apoptoza sürüklenmesi, besin transportunun sekteye uğraması gibi durumların oluşmasına sebebiyet vermektedir. 1-2 mm ve 0,5-1 mm boyutlarında β -TCP içeren doku iskelelerinin gözenek boyutlarının diğer malzemelere kıyasla nispeten daha yakın olduğu ve gözeneklerinin açık yapıda olduğu düşünülmektedir. Hiç β -TCP içermeyen gruplarda ise gözeneklerin daha kapalı yapıda ve daha küçük çaplı olduğu düşünülmektedir ve buna bağlı olarak da hücre üremesinin kısıtlanması hem besin hem de alan yetersizliğine bağlanmıştır.

- *In vitro* hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen hücre canlılığı sonuçları gruplar arasında karşılaştırıldığında β -TCP içeren gruplarda daha yüksek canlılığa rastlanmıştır. Bu durum, osteokondüktif bir malzeme olan β -TCP'nin kemik hücreleri üzerindeki hücre çoğalmasını tetikleyici etkisinin kaçınılmaz sonucudur.
- *In vitro* çalışmaların genel sonuçlarına bakıldığında %40 (a/a) β -TCP ilavesinin tüm PU yapılarında hücre çoğalmasını, göçünü ve metabolizmasını pozitif yönde etkilediği görülmektedir. Çalışma kapsamında elde edilen bulgulara dayanarak, β -TCP boyutlarının nihai malzemenin başarısına etki ettiği ve bunu yüksek oranda gözenek boyutu ve dağılımını etkileyerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir.
- %40 oranında (a/a) 1-2 mm boyutunda β -TCP içeren PU doku iskelelerine sitotoksosite testi ISO 10993-2 standardı gereğince elüsyon yöntemiyle L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En yüksek malzeme konsantrasyonuna sahip besi ortamında inkübe edilmiş hücrelerde, kontrol grubu %100 kabul edildiğinde, %85,75 canlılık gözlenmiştir. ISO-10993 standardına göre, hücre canlılığı %70'in altında bulunduğunda malzemeler toksik olarak nitelendirilebilir. Sitotoksosite testi sonucu görülen yaklaşık %86 hücre canlılığı üretilen malzemelerin toksik olmadığını göstermektedir.
- Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen poliüretan kemik yapıştırıcısı ve farklı partikül boyutu (0,5-1 mm, 1-2 mm ve 2-4 mm) ve ağırlıkça farklı yüzdelerde (%20, %30 ve %40) β -TCP içeren PU/ β -TCP kompozit doku iskelelerine ait yukarıda verilen analiz sonuçları doğrultusunda geliştirilen kemik yapıştırıcısının adezyon özellikleri bakımından belirlenen amaç ve hedeflere uygun olduğu tespit edilmiştir.

Hazırlanan doku iskeleleri gözenek yapısı, gözeneklilik oranı, biyouyumluluk gibi özellikler bakımından oldukça uygun bulunurken mekanik dayanım bakımından literatürde yer alan poliüretan çalışmalarına göre oldukça yüksek sonuçlar vermiş ancak hedef kemik dokusunun mekanik dayanım değerlerine göre düşük bulunmuştur. Ayrıca poliüretan yapısına eklenen β -TCP yüzdesi arttıkça doku iskelelerinin mekanik dayanımının arttığı gözlemlenirken, 1-2 mm partikül boyutunda %40 (a/a) β -TCP içeren doku iskelesinin en yüksek mekanik dayanımı gösterdiği tespit edilmiştir. 0,5-1 mm %40 (a/a) β -TCP içeren grupta yakın sonuçlar elde edilmesine rağmen en yüksek partikül boyutunda (2-4 mm) mekanik dayanımın düştüğü gözlenmiştir.

- Mekanik dayanımın hedef kemik dokusu değerlerine göre düşük bulunmasının sebebi olarak kullanılan suyun stokiometrik oranının gözenek miktarını çok fazla arttırdığı ve buna bağlı olarak da malzemenin mekanik dayanımını düşürdüğü düşünülmektedir. Ayrıca büyük boyutlu β -TCP kullanımının gözenek boyut dağılımını yüksek oranda etkileyerek birbirinden farklı boyutlarda gözeneklerin oluşmasına sebep olduğu ve bu durumun gözeneklerin birbiri ile bağlılık durumunu olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda ileride yapılacak çalışmalarda; mekanik dayanımı arttırmak amacıyla su miktarı, NCO ve diol grupları ile yapılacak hesaplamalar ile reaksiyon sırasında üretilen CO_2 yardımıyla gözenek yapısı ayarlanabilir. Ayrıca farklı NCO ve diol gruplarına sahip izosiyanat ve poliol'ler kullanılarak farklı oranlarda sert segment ve yumuşak segment içeren poliüretan yapıları elde edilerek de mekanik dayanım artırılabilir.
- Bugün tıpta kemik stabilizasyonu için implant, vida veya plak kullanımı gibi pek çok yöntem bulunmaktadır. Ancak bu yöntemlerin yeni kırıklara neden olma, çevre dokulara zarar verme veya yerleştirilecekleri bölge ile uyum sağlamama gibi dezavantajları vardır. Özellikle düzensiz yüzeyle kırıklar veya çok parçalı kırıklar gibi kırık tipleri için klinikte kullanılan mevcut yöntemlerin dezavantajları dikkate alındığında sert doku yapıştırıcılarına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu bakımdan bu tez çalışması kapsamında hazırlanan poliüretan kemik yapıştırıcısı ve bunları içeren kompozit kemik greft materyallerinin (doku iskeleleri) nihai bir ürün formuna dönüşebilme ve klinikte önemli bir tıbbi ihtiyacı karşılama potansiyeline sahiptir.

Ayrıca yük taşıyan bölgeler için ise bu çalışmada geliştirilen kemik yapıştırıcısının mekanik dayanım özelliklerini arttıracak formülasyonlar geliştirilmesiyle yenileyici tıp alanında pek çok endikasyonda kullanım potansiyeli olabilecek yenilikçi malzeme geliştirme çalışmalarına büyük katkısı olacaktır.



KAYNAKLAR

- [1] Willems, NM., Langenbach, GE., Everts, V., Zentner, A., The microstructural and biomechanical development of the condylar bone: a review, *European Journal of Orthodontics*, 36(4):479-85, **2014**
- [2] Ortner, D., Turner-Walker, G., *The Biology of Skeletal Tissues, in Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*, Second ed. Academic Press, 479p, **2003**.
- [3] Akay, T., *Genel Histoloji*, Altıncı Baskı, Palme Yayınları, ISBN 975-7477-92-3 P: 141-162, **2006**
- [4] Bouvier, M., *The biology and composition of bone*. Bone Mechanics. In: Cowin C.S. editor Florida: CRC press; p.2–13, **1989**
- [5] Guyton, A.C., Hall, J.E., *Tıbbi fizyoloji cep kitabı*, (Çev. Z. Solakoğlu), Nobel Tıp Kitabevleri, 728p, **2003**
- [6] Vaananen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., Hallen, J.M., The cell biology of osteoclast function, *Journal of Cell Science*, 113(pt 3), 377-381, **2000**
- [7] Downey, PA., Siegel, MI., Bone biology and the clinical implications for osteoporosis., *Physical Therapy*, 86(1):77-91, **2006**
- [8] Webster, T.J., Nanophase ceramics: The future orthopedic and dental implant material, *Advances in Chemical Engineering*, Academic Press; 125-66, **2001**
- [9] Currey, J.D., *Bones: Structure and Mechanics*, Princeton University Press, Princeton, **2002**
- [10] Junqueira L.C and Carneiro J., *Basic Histology*, 10th ed. Chapter 8, McGraw-Hill, New York, **2003**
- [11] Amit, S.M., Antonios, G. M., Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration, *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 94: 1–22, **2005**
- [12] Yılğör, P., Huri, P., Hasırcı, N., Hasırcı, V., Kemik doku mühendisliği, *Dergi Park*, Cilt 19,Sayı 4, **2010**

- [13] Muhammad Iqbal, S., Xiaoxue, X., Li, L., A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications, *Journal of Materials Science*, 44:5713–5724, **2009**
- [14] Langer, R., Vacanti, JP., Tissue engineering. *Science*, 260:920–926, **1993**
- [15] Spaans, CJ., Belgraver, VW., Rienstra, O., et al. Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus, *Biomaterials*, 21: 2453–2460, **2000**
- [16] Boccaccini, AR., Roether, JA., Hench, LL., et. al. Composites approach to tissue engineering, *Ceramic Engineering and Science Proceedings*, 23: 805–816, **2002**
- [17] Yılgor, P., Sousa, RA., Reis, RL., et. al. 3D Plotted PCL Scaffolds for Stem Cell Based Bone Tissue Engineering, *Macromolecular Symposia*, 269:92-99, **2008**
- [18] Kenar, H., Köse, GT., Hasırcı, V.. Tissue Engineering Of Bone On Micropatterned Biodegradable Polyester Films, *Biomaterials*, 27: 885–95, **2006**
- [19] Köse, GT., Korkusuz, F., Korkusuz, P., et al., *In vivo* tissue engineering of bone using poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) and collagen scaffolds, *Tissue Engineering*, 10(7-8): 1234-1250, **2004**
- [20] Murphy, WL., Peters, MC., Kohn, DH., et. al., Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 21(24):2521-2527, **2000**
- [21] Tuzlakoglu, K., Alves, CM., Mano, JF., et. al. Production and characterization of chitosan fibers and 3D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications, *Macromolecular Bioscience*, 4:811-819, **2004**
- [22] Haynesworth, SE., Goshima, J., Goldberg, VM., et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow, *Bone*, 13: 81–88, **1992**
- [23] Caplan, AL., Method for enhancing the implantation and differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells, *US patent 5197985*, **1993**

- [24] Nefussi, JR., Brami, G., Modrowski, D., et. al., Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation *in vitro*, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45: 493–503, **1997**
- [25] Jansen, JA., Vehof, JWM., Ruhe, PQ., et. al., Growth Factor-Loaded Scaffolds For Bone Engineering, *Journal of Controlled Release*, 101:127–136, **2005**
- [26] White, AP., Vaccaro, AR., Hall, JA., et. al., Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, non-unions and spinal fusion, *International Orthopaedics*, 31: 735-741, **2007**
- [27] Fellah, B.H., Gauthier, O., Weiss, P., Chappard, D., Layrolle, P., *Biomaterials*, 1177-1188, **2008**
- [28] J.F. Mano, R.A. Sousa, L.F. Boesel, N.M. Neves, R.L. Reis, *Composites Science and Technology*, 64, 789-817, **2004**
- [29] Sandra, B., Functional Materials as Bone Adhesive for Fracture Stabilization, *Master of Science Thesis Stockholm, Sweden*, **2011**
- [30] David, F., Bone adhesives for trauma surgery: A review of challenges and developments, *International Journal of Adhesion & Adhesives* 33, 89–97, **2012**
- [31] Gogolewski, S., Gorna, K., Biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes in the treatment of iliac crest defects, *Journal of Biomedical Materials Research*, 80:94–101, **2007**
- [32] Gogolewski, S., Gorna, K., Turner, AS., Regeneration of bicortical defects in the iliac crest of estrogen-deficient sheep, using new biodegradable polyurethane bone graft substitutes, *Journal of Biomedical Materials Research*, 77:802–10, **2006**
- [33] Zdrahala, RJ., Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future, *Journal of Biomaterials Applications*, 14: 67-90, **1999**
- [34] McGill, DB., Motto, JD., An industrial outbreak of toxic hepatitis due to methylenedianiline, *The New England Journal of Medicine*, 291: 278-282, **1974**
- [35] Gogolewski, S., Pennings, AJ., Biodegradable materials of polylactides, 4 Porous biomedical materials based on mixtures of polylactides and polyurethanes, *Macromolecular Rapid Communications*, 3: 839-845, **1982**

- [36] Donkerwolcke, M., Burny, F., Muster, D., Tissues and bone adhesives – historical aspects, *Biomaterials*, 19:1461–6, **1998**
- [37] Bloch, B., Bonding of fractures by plastic adhesives, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 40A:804–12, **1958**
- [38] Meyer, G., Muster, D., Schmitt, D., et al., Bone bonding through bioadhesives: present status, *Biomaterials, Medical Devices and Artificial Organs*, 7:55–71, **1979**
- [39] Brauer, GM., Kumpula, JW., Termini, DJ., Davidson, KM., Durability of the bond between bone and various 2-cyanoacrylates in an aqueous environment, *Journal of Biomedical Materials Research*, 13:593–606, **1979**
- [40] Benthien, JP., Russlies, M., Behrens, P., Investigating the effects of bone cement, cyanoacrylate glue and marine mussel adhesive protein from *Mytilus edulis* on human osteoblasts and fibroblasts *in vitro*, *Annals of Anatomy*, 186:561–6, **2004**
- [41] Cameron, RE., Kamvari-Moghaddam, A., *Synthetic bioresorbable polymers*, In: Buchanan F, editor. *Degradation Rate of Bioresorbable Materials: Prediction and Evaluation*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., **2008**
- [42] Ho, S-M., Young, AM., Synthesis, polymerisation and degradation of poly(lac- tide-co-propylene glycol) dimethacrylate adhesives, *European Polymer Journal*, 42: 1775–85, **2006**
- [43] Young, AM., Ho, SM., Abou, Neel EA., et al., Chemical characterization of a degradable polymeric bone adhesive containing hydrolysable fillers and interpretation of anomalous mechanical properties, *Acta Biomaterialia*, 5: 2072–83, **2009**
- [44] Gellynck, K., Abou Neel, EA., Li, HY., et al., Cell attachment and response to photocured, degradable bone adhesives containing tricalcium phosphate and purmorphamine, *Acta Biomaterialia*, 7:2672–7, **2011**
- [45] Young, AM., Ho, SM., Drug release from injectable biodegradable polymeric adhesives for bone repair, *Journal of Controlled Release*, 127:162–72, **2008**
- [46] Heiss, C., Kraus, R., Peters, F., et al., Development of a bioresorbable self- hardening bone adhesive based on a composite consisting of polylactide methacrylates and b-

tricalcium phosphate, *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 90B:55–66, **2009**

- [47] Bauer, NB., Brinke, N., Heiss, C., et al., Biodegradable b-tri-calciumphosphate/hydroxyethyl methacrylate enhanced three component bone adhesive demonstrates biocompatibility without evidence of systemic toxicity in a rabbit model, *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 90B:767–77, **2009**
- [48] Chivers, RA., Wolowacz, RG., The strength of adhesive-bonded tissue joints, *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 17:127–32, **1997**
- [49] Burke, SA., Ritter-Jones, M., Lee, BP., Messersmith, PB., Thermal gelation and tissue adhesion of biomimetic hydrogels, *Biomedical Materials*, 2:203–10, **2007**
- [50] Shao, H., Bachus, KN., Stewart, RJ., A water-borne adhesive modeled after the sand castle glue of *P. Californica*, *Macromolecular Bioscience*, 9:464–71, **2009**
- [51] Greenwald, AS., Boden, SD., Goldberg, VM., Khan, Y., Laurencin, CT., Rosier, RN., Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 83-A(Suppl 2, Pt 2):98-103, **2001**
- [52] Szpalski, M., Gunzburg, R., Applications of calcium phosphatebased cancellous bone void fillers in trauma surgery, *Orthopedics*, 25(5 Suppl):601-9, **2002**
- [53] Moore, WR., Graves, SE., Bain, GI., Synthetic bone graft substitutes, *ANZ Journal of Surgery*, 71(6):354-61, **2001**
- [54] Bauer, TW., Muschler, GF., Bone graft materials. An overview of the basic science, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 371:10-27, **2000**
- [55] Burwell, RG., Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft autograft of cancellous bone. An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts, *The Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, 46-B:110-40, **1964**
- [56] Finkemeier, CG., Bone-grafting and bone-graft substitutes, *The Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 84-A(3):454-64, **2002**
- [57] Fleming, JE Jr., Cornell, CN., Muschler, GF., Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering, *Orthopedic Clinics of North America*, 31(3):357-74, **2000**

- [58] Şimşek, A., Çakmak, G., Cila ,E., Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler, *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi*, Cilt: 3 Sayı: 3-4, **2004**
- [59] Clarke, K.I., Graves, S.E., Wong, A.T.C. and Triffitt, J.T., Investigation into the formation and mechanical properties of a bioactive material based on collagen and calcium phosphate, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 4: 107–110, **1993**
- [60] Rodrigues, C.V.M., Serricella, P., Linhares, A.B.R., Guerdes, R.M., Borojevic, R., Rossi, M.A., Duarte, M.E.L. and Farina, M., Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 24: 4987–4997, **2003**
- [61] Liu, X., Ma, P.X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3): 477-486, **2004**
- [62] Miko, A.G. and Temenoff, J.S., Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 13(2): 114–119, **2000**
- [63] Sukhodub, L.F., Moseke, C., Sukhodub, L.B., Sulkio-Cleff, B., Maleev, V.Y., Semenov, M.A., Berezhnyak, E.G. and Bolbukh, T.V., Collagenhydroxyapatite-water interactions investigated by, X.R.D., piezogravimetry, infrared and Raman spectroscopy, *Journal of Molecular Structure*, 704(1–3): 53–58, **2004**
- [64] Boccaccini, A.R., Maquet V., Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications, *Composites Science and Technology*, 63: 2417–2429, **2003**
- [65] Bil, M., et al., Optimization of the structure of polyurethanes for bone tissue engineering applications, *Acta Biomaterialia*, 6(7): p. 2501-10, **2010**
- [66] Ebrahimi, M., Pripatnanont, P., Monmaturapoj, N., Suttapreyasri, S., Fabrication and characterization of novel nano hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate scaffolds in three different composition ratios, *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 100A, 2260–2268, **2012**
- [67] Schreder, K., Bayer, IS, Milner, DJ, Loth, E , Jasiuk, I; A Polyurethane-Based Nanocomposite Biocompatible Bone Adhesive, *Applied Polymer Science*, 127(6), 4974-4982, **2012**

- [68] Dong, Z., Li, Y., and Zou, Q.; Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering, *Applied Surface Science*, (255), 6087–6091, **2009**
- [69] Joanna L. Ryszkowska, Monika Auguscik, Ann Sheikh, Aldo R. Boccaccini, Biodegradable polyurethane composite scaffolds containing Bioglass® for bone tissue engineering, *Composites Science and Technology*, Volume 70, Issue 13, 15, Pages 1894-1908, **2010**
- [70] M. Meskinfam, S. Bertoldi, N. Albanese, A. Cerri, M.C. Tanzi, R.Imani, N. Baheiraei, M. Farokhi, S. Farè, Polyurethane foam/nano hydroxyapatite composite as a suitable scaffold for bone tissue regeneration, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 82, Pages 130-140, **2018**
- [71] Mi HY, Salick MR, Jing X, Jacques BR, Crone WC, Peng XF, Turng LS, Characterization of thermoplastic polyurethane/polylactic acid (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding, *Materials Science and Engineering: C*, 33(8):4767-76, **2013**
- [72] Barrioni, B.R., de Carvalho, S.M., Oréfice, R.L., de Oliveira, A.A.R., and de Magalhães Pereira, M.; Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications, (52), 22-30, **2015**
- [73] ¹H-NMR Chemical Shifts, California State Polytechnic University, Pomona, <https://www.cpp.edu/~lsstarkey/courses/NMR/NMRshifts1H-general.pdf> (Nisan,2018)
- [74] D'Arlas DF, Rueda L, De La Caba K, Mondragon I, Eceiza A., Microdomain composition and properties differences of biodegradable polyurethanes based on MDI and HDI, *Polymer Engineering & Science*, 48, 519–529, **2008**
- [75] Asefnejad, A., Behnamghader, A., Khorasani, M.T., Farsadzadeh, B. Polyurethane/fluor-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Part I: morphological, physical, and mechanical characterization, *International Journal of Nanomedicine*, 6:93-100, **2011**
- [76] Gorna, K. and S. Gogolewski, Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes, *Journal of Biomedical Materials Research*, 67(3): p. 813-27, **2003**

- [77] Kevin J. Schreader, Ilker S. Bayer, Derek J. Milner, Eric Loth, Iwona Jasiuk, A Polyurethane-Based Nanocomposite, Biocompatible Bone Adhesive, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 33, Issue 8, Pages 4767-4776, **2013**

- [78] F. Cedano, J. Casas, C. Castro, D. Tabima, C. Moreno, J. Briceño, *First Approach Of A Protocol For Test Bone Adhesives*, XXIV Congress of the International Society of Biomechanics, Brazil, **2013**



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Meryem Erken

Doğum yeri : Ankara

Medeni Hali : Bekar

E-posta : meryemerken1989@gmail.com

Adresi : Fakülteler Mah.Yargıç Sok. 16/7 Cebeci/Ankara

Eğitim

Lisans :Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, iyi seviye

Almanca, orta seviye

İş Deneyimi

2015- : Sınai Mülkiyet Uzman Yardımcısı, Türk Patent ve Marka Kurumu

2014-2015 : Kalite Yönetim Sorumlusu, Osimplant

Deneyim Alanları

Kemik doku mühendisliği, Biyomalzemeler



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 14/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: Poliüretan Tabanlı Kemik Yapıştırıcısı Formülasyonları

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 83 sayfalık kısmına ilişkin, 14/06/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin*. adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1-Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar dâhil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

14.06.2018

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Meryem ERKEN

Öğrenci No: N14220279

Anabilim Dalı: Biyomühendislik

Programı: Tezli Yüksek Lisans

Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. Halil Murat AYDIN