

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GRAFEN OKSİT KATKILI NANOKOMPOZİT DOKU İSKELELERİNİN
SÜPERKRİTİK KARBONDİOKSİT ORTAMINDA HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Simge YILDIRIM

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2018**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Simge YILDIRIM tarafından hazırlanan "Grafen Oksit Katkılı Nanokompozit Doku İskelelerinin Süperkritik Karbondioksit Ortamında Hazırlanması ve Karakterizasyonu" adlı tez çalışması 23/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman :  Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:


Başkan: Prof. Dr. Nuray YILDIZ
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı


Üye : Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı


Üye : Yrd. Doç. Dr. Işıl BEŞKARDEŞ
Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

23/05/2018



Simge YILDIRIM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GRAFEN OKSİT KATKILI NANOKOMPOZİT DOKU İSKELELERİNİN SÜPERKRİTİK CO₂ ORTAMINDA HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Simge YILDIRIM

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Sunulan tez çalışması kapsamında, kemik doku mühendisliği için 3-boyutlu, gözenekli, biyobozunur ve biyoyumlu özellikte polikaprolakton ve polikaprolakton-grafen oksit doku iskelelerinin süperkritik CO₂ ortamında (SK-CO₂) elde edilmesi ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bu hedefle süperkritik ortamında faz ayırımı yöntemi kullanılmıştır. En uygun çalışma koşullarını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda hazırlanan doku iskeleleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiş ve uygun morfolojik yapıya sahip (gözeneklilik, gözenek boyutu) doku iskeleleri belirlenmiştir. Buna göre 165 bar basınç, 35 °C sıcaklık, 2.5 saat difüzyon, 2.5 saat çözücü uzaklaştırma ve 5g/dk CO₂ akış hızı koşullarında hazırlanan doku iskelelerinin homojen gözenek dağılımına sahip olduğu bulunmuştur. Tez çalışmasının ikinci aşamasında polikaprolakton-grafen oksit doku iskeleleri polikaprolakton çözeltisine belli oranlarda (% 1 ve % 3 % w/w) grafen oksit eklenerek süperkritik akışkan ortamında faz ayırma yöntemiyle elde edilmiştir. Hazırlanan doku iskeleleriyle yürütülen hücre kültürü çalışmalarında MTT testi gerçekleştirilmiştir. Polikaprolakton -grafen oksit doku iskelelerinin hücre canlılığı üzerine *in-vitro* ortamda toksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Elde edilen bulgular ışığında, hazırlanan polikaprolakton-grafen oksit doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Mayıs 2018, 71 sayfa

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği, süperkritik karbondioksit, kompozit, doku iskelesi, polikaprolakton, grafen oksit.

ABSTRACT

Master Thesis

FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF GRAPHENE OXIDE MODIFIED NANOCOMPOSITE TISSUE SCAFFOLDS USING SUPERCRITICAL CARBONDIOXIDE

Simge YILDIRIM

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

The aim of the study is to fabricate three dimensional, porous, biodegradable and biocompatible polycaprolactone and polycaprolactone-graphene oxide scaffolds by using supercritical carbon dioxide (CO₂) assisted process for tissue engineering applications. For this aim; supercritical carbon dioxide assisted phase separation method were used. Scaffolds were characterize by using scanning electron microscopy (SEM) to determine the most suitable process conditions. The optimum conditions were decided to be 165 bar pressure, 35 °C temperature, 2.5 h diffusion, 2.5 h solvent extraction and 5g/min CO₂ flow rate. In the second part of the study, various amounts of graphene oxide (% 1 and % 3 % w/w) were added to polycaprolactone solution to fabricate polycaprolactone-graphene oxide nanocomposite scaffolds by using supercritical carbon dioxide assisted phase separation. Characterization studies, were performed by using SEM, raman spektroskopy, X-Ray Diffractometry (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis. Cell culture studies were carried out with these scaffolds. It was seen that polycaprolactone-graphene oxide scaffolds do not have any toxic effects on cell viability at *in vitro* environment. It was concluded that polycaprolactone-graphene oxide scaffolds fabricated by using supercritical carbon dioxide shall be used for bone tissue engineering applications.

May 2018, 71 pages

Key Words: Tissue engineering, supercritical carbon dioxide, composite, scaffold, polycaprolactone, graphene oxide

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında desteğini esirgemeyen, tecrübelerinden ve bilgilerinden yararlanmamı sağlayan tez danışmanım Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamda Ankara Üniversitesi Süperkritik Akışkan ve Nanomalzeme Araştırma Laboratuvar'ında bulunan süperkritik akışkan sistemi kullanılmıştır. Bu sırada gösterdiği anlayış ve ilgi için Prof. Dr. Nuray YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Ceren ATİLA DİNÇER'e teşekkür ederim.

Doku iskelelerinin FTIR-ATR analizi Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmama verdiği desteklerden dolayı Belgin ASLAN'a ve hücre kültürü çalışmalarımda yardımını esirgemeyen T. Tolga DEMİRTAŞ'a teşekkür ederim.

Beni her zaman manevi olarak destekleyen Biyomalzeme Bilimi ve Mühendisliği Laboratuvarı (BSEL), Süperkritik Akışkan ve Nanomalzeme Laboratuvarı ve Nano-MEM Araştırma Labotaruvarı arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hayatımın her anında yanımda olan ve tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen anneme ve babama gösterdikleri sabır ve yardımları için içtenlikle teşekkürlerimi sunuyorum.

16L0443003 proje no'lu bu tez çalışması 'Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' tarafından desteklenmiştir.

Simge YILDIRIM

Ankara, Mayıs 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Doku Mühendisliği.....	3
2.2 Doku Mühendisliği Bileşenleri.....	4
2.2.1 Doku iskelelerinin genel karakteristik özellikleri	6
2.2.1.1 Biyouyumluluk	6
2.2.1.2 Biyobozunurluk.....	6
2.2.1.3 Mekanik özellikler.....	6
2.2.1.4 Üç boyutlu (3B) yapı	6
2.2.1.5 Gözenek boyutu ve gözeneklilik.....	7
2.3 Doku İskeleleri Üretiminde Kullanılan Biyomateryaller	7
2.3.1 Polikaprolakton (PCL)	9
2.3.2 Grafen temelli materyaller	11
2.3.3 Biyanokompozitler	13
2.4 Doku İskelesi Üretim Yöntemleri	17
2.4.1 Doku iskelesi klasik üretim yöntemleri.....	17
2.4.1.1 Fiber bağlama.....	17
2.4.1.2 Elektroegirme	17
2.4.1.3 Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma	18
2.4.1.4 Gaz köpükleştirme	18
2.4.1.5 Faz ayırma	18
2.4.1.6 Dondurarak kurutma	19

2.4.1.7 Eriyik kalıplama.....	19
2.4.2 Doku iskelesi gelişmiş üretim yöntemleri.....	21
2.4.2.1 Hızlı prototip yöntemler	21
2.4.2.2 Yerinde fotopolimerizasyon	21
2.4.2.3 Süperkritik akışkan teknolojisi.....	21
2.4.2.3.1 Süperkritik akışkanlar ve özellikleri.....	22
2.5 Süperkritik Akışkan Kullanılarak Doku İskelesi Elde Etme Yöntemleri	24
2.5.1 Gaz köpükleştirme yöntemi	24
2.5.2 Faz ayırma yöntemi.....	27
2.5.3 Jel kurutma yöntemi	28
2.5.4 Süperkritik akışkan emülsiyon kalıplama yöntemi	29
2.5.5 Süperkritik destekli elektroçirime.....	29
2.5.6 CO ₂ kullanılarak hidrojel köpükleştirme	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1 Materyal	32
3.2 Yöntem	34
3.2.1 Süperkritik akışkan ortamında faz ayrımı ve partikül uzaklaştırma yöntemiyle doku iskelelerinin üretimi	34
3.2.1.1 Grafen oksit içermeyen doku iskelelerinin sentezi.....	34
3.2.1.2 Grafen oksit katkılı polikaprolakton doku iskelelerinin hazırlanması.....	35
3.3 Karakterizasyon Çalışmaları	36
3.3.1 Taramalı elektron mikroskobu ile analiz (SEM)	36
3.3.2 Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR-ATR Analizi)	36
3.3.3 Raman spektroskopisi.....	36
3.3.4 X-ışınları kırınımı (XRD)	37
3.3.5 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM).....	37
3.3.6 Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)	37
3.3.7 <i>In-vitro</i> hücre kültürü çalışmaları	37
3.3.7.1 Hücre canlılığı tayini.....	37
3.3.7.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1 Süperkritik Akışkan Ortamında Faz Ayrımı ve Partikül Uzaklaştırma ile Polimerik Doku İskelelerinin Üretimi.....	39

4.2 Grafen Oksit Katkılı PCL Doku İskelelerinin skCO₂ Ortamda Faz Ayrımı ve Partikül Uzaklaştırma Yöntemi ile Elde Edilmesi.....	48
4.3 PCL ve Grafen Oksit Katkılı PCL Nanokompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	51
4.3.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik yapının belirlenmesi	51
4.3.3 X-Işınları Kırınımı (XRD) Analizi.....	55
4.3.4 Raman Spektroskopisi Analizi.....	56
4.3.5 Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi.....	57
4.3.6 Hücre kültürü çalışmaları	58
5. SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER DİZİNİ

Na_2CO_3	Sodyum karbonat
NaHCO_3	Sodyum bikarbonat
T_g	Camsı geçiş sıcaklığı
skCO_2	Süperkritik karbondioksit
T_c	Kristalizasyon sıcaklığı
T_m	Erime sıcaklığı

Kısaltmalar

ECM	Hücre dışı matris
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PLA	Polilaktik asit
PGA	Poliglikolik asit
PCL	Polikaprolakton
GO	Grafen oksit
DCM	Diklorometan
HFIP	Hekzafloroizopropilalkol (Hekzafloroizopropanol)
EL	Etil laktat
NaCl	Sodyum klorür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DPBS	Dulbecco's fosfat tampon çözeltisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
FTIR-ATR	Fourier Transform kızılötesi spektroskopisi
XRD	X-ışınları kırınımı
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
MTT	3-[4,5-dimetylhlthylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Doku mühendisliği yaklaşımıyla doku rejenerasyonu	4
Şekil 2.2 Doku mühendisliğinde bileşenler	4
Şekil 2.3 Doku iskeleleri üretiminde kullanılan biyomateryaller	7
Şekil 2.5 Grafen oksidin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.6 Süperkritik akışkanların faz diyagramındaki yeri.....	22
Şekil 2.7 Süperkritik CO ₂ destekli gaz köpükleştirme yönteminin şematik gösterimi.....	25
Şekil 4.1 1-4 dioksanla çözücüsüyle elde edilen PCL doku iskelelerinin makroskopik görüntüsü ve SEM görüntüleri	43
Şekil 4.2 DCM çözücüsüyle elde edilen PCL doku iskelesinin makroskopik görüntü ve SEM kesit görüntüsü.....	44
Şekil 4.3 EL çözücüsüyle hazırlanan PCL doku iskelelerinin makroskopik görüntüsü ve SEM görüntüleri.....	46
Şekil 4.4.a. Etil laktat çözücüsü, b. çözücü döküm ile hazırlanmış doku iskelesi, c. süperkritik işlemle elde edilmiş doku iskelesinin FTIR-ATR spektroskopisi.....	47
Şekil 4.5 EL ve DCM çözücüleriyle hazırlanan PCL-GO nanokompozit doku iskelelerinin elde edilmesi.....	49
Şekil 4.6 DCM çözücüsü içinde sonikasyon işlemi gerçekleştirilen PCL-GO kompozit doku iskelelerinin makroskopik görüntüsü.....	50
Şekil 4.7 SK-CO ₂ ortamda faz ayrımı / partikül uzaklaştırma sonrasında, EL çözücüsüyle hazırlanan PCL ve PCL-GO doku iskelelerinin makroskopik görüntüleri	50
Şekil 4.8 Grafen oksidin a. 100nm, b. 500 nm’de alınan TEM görüntüleri.....	51
Şekil 4.9 EL çözücüsüyle ile hazırlanan PCL, PCL-% 1GO ve PCL-% 3GO nanokompozit doku iskelesinin SEM görüntüleri.....	52
Şekil 4.10 PCL doku iskelesine ait FTIR-ATR spektrumu	53
Şekil 4.11 GO’nun yapısına ait FTIR-ATR spektroskopisi.....	54
Şekil 4.12 PCL-% 3 GO yapıya ait FTIR-ATR spektrumu	54
Şekil 4.13 a. GO, b. PCL, PCL-% 1GO ve PCL-% 3GO’nun XRD spektrumları	55
Şekil 4.14.a. GO, b.PCL, c. PCL-% 1GO, d. PCL-% 3GO’ya ait raman spektrumları	56

Şekil 4.15 PCL ve PCL-% 3GO doku iskeleleri için DSC eğrileri.....	57
Şekil 4.16.a.5 günlük hücre kültürü çalışmaları sonunda EL çözücüsü kullanılarak hazırlanan PCL, PCL-% 1GO ve PCL-% 3GO doku iskelelerinin MTT sonuçları, b. PCL, 500×, c. PCL, 5000×, d. PCL-% 1GO, 500×, e. PCL-% 1GO, 5000×, f. PCL-% 3GO, 500×, g. PCL-% 3GO, 5000×.....	60



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Doku onarımında kullanılan büyüme faktörleri ve ilgili dokudaki fonksiyonları.....	5
Çizelge 2.4 Sıvılar, gazlar ve süperkritik akışkanların yoğunluk, yayınlılık ve viskozite değerlerin karşılaştırılması.....	22
Çizelge 2.5 Süperkritik akışkan olarak kullanılan bazı maddelerin kritik sıcaklık ve basınç değerleri.....	23
Çizelge 3.1 Doku iskelelerinin sentezinde kullanılan kimyasallar	33
Çizelge 3.2 Grafen oksit içermeyen doku iskelelerinin sentezine ilişkin koşullar	35
Çizelge 4.1 Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan çözücülerin özellikleri	42

1. GİRİŞ

Doku mühendisliği, klinik problemleri çözmek için biyoloji ve mühendislik stratejilerini kullanarak hasar gören doku ve organları onarmayı amaçlamaktadır.

Doku iskeleleri; doğal hücre dışı matris olarak davranan yapılardır. Bu yapılar; hücrelerin bir araya gelmesi, çoğalması ve farklılaşması için gerekli bir destektir. Doku iskelelerinin vücut içinde kullanılabilmesi için bir takım özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Bu özellikler; 3-boyutlu, mikrogözenekli, birbiri ile bağlantılı gözenek yapısı, *in vitro* ve *in vivo* ortamda kontrollü bozunma, hücrelerin bir araya gelmesi, çoğalması, farklılaşması için uygun yüzey kimyası, implantasyon bölgesine uygun mekanik dayanıma sahip olmasıdır (Murphy vd. 2013).

Hastalıklı ve zarar gören dokuları onarmak için elde edilen doku iskelelerinin elde edilmesinde biyomateryaller kullanılır. Biyomateryaller, aynı zamanda doku gelişimine direkt olarak katkıda bulunacak besin, ilaç ve biyoaktif faktörler de içerebilirler. Bu materyaller; metaller, seramikler, polimerler ve kompozit materyallerdir (Naderi vd. 2011).

İlk sentezlenen polimerlerden olan polikaprolakton sentetik bir polimerdir. Biyobozunur yapısından dolayı doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır. Polikaprolakton polimeri en çok membran oluşturularak veya 3-boyutlu iskeleleri olarak kullanılmaktadır (Woodruff vd. 2010).

Kompozit materyaller; doku mühendisliğinde doku iskelelerinin yapısını güçlendirmek için kullanılır. Kemik doku mühendisliğinde karbon temelli materyaller sıkça kullanılmaktadır. Bu materyallerden grafen oksit; güçlü adsorpsiyon kapasitesi sayesinde hücre yapışması ve üremesini sağlamaktadır (Shin vd. 2016).

Gözenekli bir yapının oluşumu, doku iskelesi üretiminde temel amaçtır. Gözenekli doku iskelesi oluşturmak için bir çok klasik yöntem vardır. Bu yöntemler; parçacık

ekstraksiyonu, dondurarak kurutma, gaz köpükleştirme, faz ayırma, elektroğirme ve fiber bağlama gibi yöntemlerdir (Siva vd. 2015). Bu yöntemler; 3-boyutlu yapı oluşturmaya rağmen, kontrolsüz gözenek boyutu ve bağlantı, zayıf mekanik dayanım, çözücü ya da porojen atığının yapının toksisitesini etkilemesi gibi olumsuzluklar getirmiştir. Ayrıca bazı klasik yöntemlerde sıcaklığı arttırmak gerektiğinden (gaz köpükleştirme) bu durum biyolojik faktörlerin ve ilaçların bozulmalarına neden olmaktadır. Son yıllarda öne çıkan süperkritik akışkan teknolojisi doku iskelelerinin üretiminde büyük öneme sahiptir.

Süperkritik akışkanlar; basıncı ve sıcaklığı belli bir kritik değerin üstünde olan akışkanlardır. Bu akışkanlar bazı özellikleri ile sıvılara, bazı özellikleri ile de gazlara benzediği için "akışkan" kavramı kullanılır. Gazlar gibi düşük viskoziteye ve difüzyona; sıvılar gibi de birtakım çözücü özellikleri ile yüksek yoğunluğa sahiptirler. Bir çok akışkan süperkritik akışkan olarak kullanılmaktadır. Bunlar; metan etan, argon, propan, su, aseton ve karbondioksittir. Kullanımı en yaygın olan CO₂'dir. CO₂'nin seçilme nedenleri; kolay bulunur olması, yanıcı olmaması, hücrelerde toksik madde oluşturmaması, kararlı yapıda olması, pahalı olmaması, çevre dostu olması ve kritik sıcaklık ve basıncının kolay ayarlanabilir olmasıdır.

Süperkritik akışkanlar; doku mühendisliğinde son yıllarda artan öneme sahiptir. Doku iskelesi üretiminde süperkritik akışkanlarla en çok kullanılan yöntemler; faz ayırma, gaz köpükleştirme ve jel kurutma yöntemleridir.

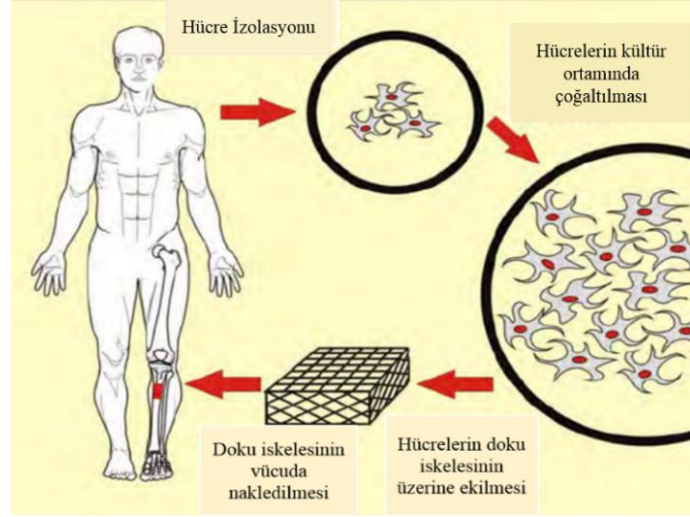
Tez çalışmasının amacı; mikrogözenek yapısında polikaprolakton-grafen oksit doku iskelelerinin süperkritik CO₂ (skCO₂) ortamında elde edilmesi ve karakterizasyon çalışmalarıyla doku mühendisliğinde kullanımının incelenmesidir. SkCO₂ ile faz ayırma yöntemi kullanılarak % 15 derişimde hazırlanan PCL çözeltisinden doku iskeleleri elde edilmiştir. Elde edilen doku iskelelerinin SEM ile gözenek yapıları, XRD ile kristalinitesi, raman spektroskopisi ile grafen oksidin yapıya katılıp katılmadığı hücre kültürü çalışmalarında ise doku iskelelerinin biyoyumluluğu incelenmiştir. Araştırma sonuçlarından elde edilen bulgular ışığında, kompozit doku iskelesinin kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceği görülmüştür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu kısımda tez çalışmasını içeren teorik bilgiler verilmiştir. İlk olarak doku mühendisliği ve doku mühendisliği bileşenleri ele alınmış, daha sonra tez çalışması kapsamında üretilen doku iskelelerinin sahip olması gereken genel özellikler açıklanmış ve bu doku iskelelerinin ne tür biyomateryallerden üretildiği üzerinde durulmuştur. Tez çalışmasında kullanılan polikaprolakton ve grafen oksidin yapıları ve özellikleri açıklanmıştır. Son olarak, doku iskelesi üretilmesinde kullanılan klasik yöntemlerin üzerinde durulmuş ve tez kapsamında kullanılan süperkritik akışkan teknolojisi ile doku iskelesi üretimi ve bu yöntemin avantajları açıklanmıştır.

2.1 Doku Mühendisliği

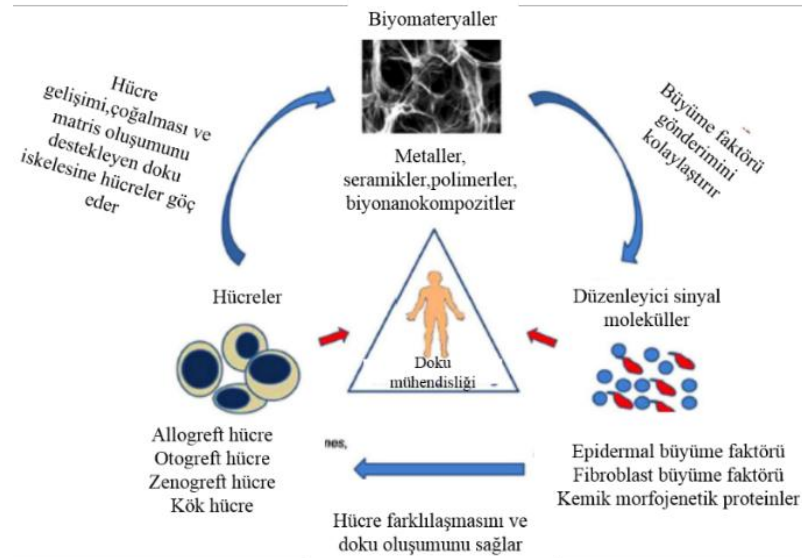
Belirli bir hastalık ya da kaza sonucu organ veya dokularda hasar meydana gelebilmektedir. Bu durumdan etkilenen dokular ya da organlar orijinal yeteneğine geri döndürülemez. Allogreft (sağlıklı bireyden alınan) veya otogreft (hastanın kendisinden alınan) transplantasyon cerrahisinde başarılı sonuçlar elde edilmesine karşın, iyileşme sürelerinin uzun olması, nakledilen dokunun veya organın vücut tarafından reddedilmesi ve organ bekleyen hastaların fazlalığına oranla donör sayısının azlığı önemli dezavantajları oluşturmaktadır. Doku ve organ nakillerinin bu dezavantajlarından dolayı doku mühendisliği araştırma alanı ortaya çıkmıştır. Doku mühendisliğinin ilk ve en önemli tanımı 1993 yılında Robert Langer tarafından yapılmıştır. Robert Langer doku mühendisliğini; zarar gören doku ve organları onarmak için biyoloji ve mühendislik ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir bilim dalı olarak tanımlamaktadır (Langer ve Vacanti 1993). Doku mühendisliği; biyopsi ile hücrelerin izole edilmesi ve biyomateryallerden hazırlanan yapay destek iskelelerinin üzerinde çeşitli biyomoleküller varlığında çoğaltılması ve elde edilen yapıların vücuttaki hasarlı bölgeye yerleştirilmesi prensibine dayanmaktadır (Mi vd. 2015) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Doku mühendisliği yaklaşımıyla doku rejenerasyonu (<https://link.springer.com>, 2017a)

2.2 Doku Mühendisliği Bileşenleri

Doku mühendisliğinde üç önemli bileşen **hücreler**, **biyosinyal moleküller** ve **doku iskeleleridir** (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Doku mühendisliğinde bileşenler (Hücreler + Doku İskelesi + Büyüme Faktörleri = Doku Mühendisliği Yapısı) (www.researchgate.net, 2013)

Hücreler, doku iyileşimi ve onarımında büyük öneme sahiptir. Doku mühendisliğinde kullanılan hücreler çeşitli kaynaklardan elde edilmektedir. Hastanın kendisinden alınan hücreler **otogreft hücre**, başka bir insandan alınan hücreler **allogreft hücre** ve hayvanlardan alınıp hastaya implante edilen hücreler de **zenogreft hücre** olarak tanımlanmaktadır. Ancak en çok kullanılan hücre tipi başka hücrelere farklılaşabilen **kök hücrelerdir** (Murphy vd. 2013).

Hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri gibi **biyosinyal moleküller** ise doku iskelesindeki hücrelerin davranışını ve fonksiyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. Doku mühendisliği uygulamalarının başarılı olması; hücre yapışması, göçü ve farklılaşmasını etkileyecek olan uygun biyosinyal molekülün seçilmesine bağlıdır (Murphy vd. 2013). Doku mühendisliğinde biyosinyal molekül olarak en çok kullanılan büyüme faktörleri çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Doku onarımında kullanılan büyüme faktörleri ve ilgili dokudaki fonksiyonları (Lee vd. 2011)

Büyüme faktörü	İlgili doku	Fonksiyonu
BMP-7	Kemik, kırık, böbrek	Osteoblastların farklılaşması ve göçü/ Böbreğe ait dokuların gelişimi
EGF	Deri, sinir	Epitelyel hücre gelişimi, üremesi ve farklılaşmasının düzenlenmesi
VEGF	Kan damarı	Endotel hücrelerin canlılığı, göçü ve üremesi
TGF- β	Kemik, kırık	Kemik oluşumunu sağlayan hücrelerin üremesi ve farklılaşması

Hücre dışı matris (extracellular matrix, ECM) olarak görev yapan **doku iskelelerinin** rolü, istenilen mikro çevreyi oluşturup hücrelerin üremesine ve göçüne izin vererek normal doku gelişim sürecini sağlamaktır. Doku iskelesi; hücrelerin yapışması, çoğalması ve göçünü gerçekleştirebileceği yapay destek malzemeler olarak tanımlanmaktadır. Sürecin en sonunda ise yeni doku oluşumu sağlandığında, yapay doku iskeleleri bozunmaktadır (Campardelli vd. 2015).

2.2.1 Doku iskelelerinin genel karakteristik özellikleri

Doku oluşumunu veya rejenerasyonunu gerçekleştirmek için elde edilen doku iskelelerinin birtakım özelliklere sahip olması gereklidir.

2.2.1.1 Biyouyumluluk

In vitro olarak hazırlanmış doku iskelesi vücuda nakledildiğinde vücut yapıyı reddetmemeli, iltihaplı reaksiyon oluşturmamalı, hücre gelişimi ve üremesini sağlamalı ve toksisite göstermemelidir (Patel vd. 2011).

2.2.1.2 Biyobozunurluk

Doku iskeleleri kalıcı implantlar olmadığı için vücuda nakledildiğinde belli bir süre sonra bozunma eğilimi gösterirler. Doku iskelesi, vücut kendi hücre dışı matrisini oluştururken hücrelerin geçişine izin vermek için biyobozunur olmalıdır. Yan ürünler ve bozunma ürünleri toksik olmamalı ve vücuttan kolayca atılabilmelidir (Patel vd. 2011).

2.2.1.3 Mekanik özellikler

Doku iskelesi implante edildiği bölgeye göre belirli sıkıştırma ve çekme gücüne sahip olmalıdır. Mekanik özellikler doku iskelesi bozunup yeni doku oluşumu gerçekleşinceye kadar muhafaza edilmelidir (Patel vd. 2011).

2.2.1.4 Üç boyutlu (3B) yapı

Doku iskelesi makroskopik ve mikroskopik olarak yerini alacağı dokuyla uyumlu kompleks 3-boyutlu yapıya sahip olmalıdır (Patel vd. 2011).

2.2.1.5 Gözenek boyutu ve gözeneklilik

Doku iskelesi önemli besin maddelerinin girişine ve oluşan atık maddelerin çıkışına olanak verecek gözenek boyutu ve gözenekliliğe sahip olmalıdır (Patel vd. 2011).

2.3 Doku İskeleleri Üretiminde Kullanılan Biyomateryaller

Dokuyu en iyi biçimde taklit edecek olan bir iskelenin tasarlanması doku mühendisliğinde temel amaçtır. Öncelikli olarak hedef doku için kullanılacak olan biyomateryalin seçilmesi gereklidir. Bu seçim doku yenilenmesi ve onarımı için önemlidir. Herhangi bir hata yapılması durumunda vücut içerisinde istenmeyen durumlara (iltihap veya pıhtı oluşumu) neden olabilmektedir (Zohora ve Azim 2014).

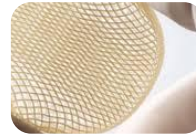
Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan biyomateryaller; metaller, seramikler, polimerler ve nanobiyokompozitler olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.3).



Metaller



Seramikler



Polimerler



Biyonanokompozitler

Şekil 2.3 Doku iskeleleri üretiminde kullanılan biyomateryaller (www.wikipedia.org, 2010)

Metaller; eşsiz elektriksel ve termal iletkenliklerinden dolayı biyomateryal olarak kullanılmaktadır. Metallerin bazı elektronları bağımsız hareket ettiği için kolaylıkla iletilebilirler. Bazı metaller mekanik özellikleri ve korozyon dirençlerinden dolayı tercih edilmektedir. Bütün bu avantajlarının yanında sınırlı işlenebilirlik gösterme ve biyobozunur olmamaları gibi dezavantajları bulunmaktadır. **Seramikler** ise genellikle

inorganik, ısıya dayanıklı ve polikristalin materyallerdir. Seramikler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Ancak düşük çekme gerilimi ve kırılma yapılarından dolayı kullanımı kısıtlanmaktadır. Metaller ve seramiklerin dezavantajlarından dolayı son yıllarda doku mühendisliğinde **Polimerler**le yapılan çalışmalar ön plana çıkmıştır. Polimerlerin farklı biçim ve oranlarda hazırlanabilmeleri yaygın olarak kullanılmalarını sağlamıştır. Polimerler, doğal ve sentetik olarak sınıflandırılabilir.

Doğal Polimerler, doğada kendiliğinden oluşan polimerlerdir. Doğada en çok bulunan doğal polimer bitki ve ağaçların temel yapısında bulunan selülozdur. Nişasta ve jelatin de doğal polimerler içinde değerlendirilmektedir. Aljinat, kollajen ve hyaluronik asit en çok kullanılan doğal polimerlerdir (Çizelge 2.2). Canlıların hareketlilik, yaşlanma ve duyu gibi özelliklerinden sorumlu olan bu polimerlere **biyopolimerler** de denmektedir (Saçak 2012).

Sentetik Polimerler: Uygun monomer veya çıkış maddeleri kullanılarak doğrudan insanlar tarafından üretilir. Polilaktik asit, poli(laktik-ko-glikolik asit) en çok kullanılan sentetik polimerlere örnek verilebilir (Saçak 2012), (Çizelge 2.2).

Doğal polimerlerin birçok avantajları vardır. Biyoaktif, biyobozunur, biyouyumludurlar. Ancak bu malzemeler belli başlı dezavantajlara sahiptirler. Bunlar; fizikokimyasal özelliklerini kontrol etme imkanı kısıtlıdır, bozunma hızlarını ayarlamak zordur, sterilizasyon ve saflaştırma tekniklerinde zorluklar yaşanmaktadır ve farklı kaynaklardan elde edildiğinde patojen/viral durumlar görülmektedir (Naderi vd. 2011).

Birçok sentetik polimer çeşitli avantajlarından dolayı doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Bu avantajlarından biyouyumluluk, işlenebilirlik ve bozunma hızı gibi gerekli kriterler polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi polimerlerle başarıyla gerçekleştirilmiştir. 3-B yapı oluşturmak için sentetik polimerlerin mekanik özellikleri, bozunma hızları ve gözenekliliği ayarlanabilmektedir. Fakat bu avantajlarına rağmen, bu materyaller biyoaktiflik açısından zayıftır (Naderi vd. 2011).

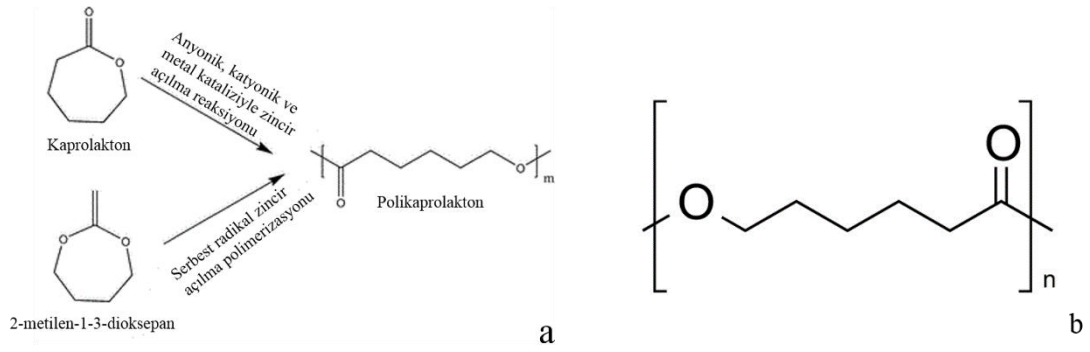
Çizelge 2.2 Doğal ve sentetik polimerlerin örneklendirilmesi

Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Aljinat	Polilaktik asit
Kolajen	Poliglikolik asit
Fibrinojen	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
Hyaluronik Asit	Polikaprolakton

2.3.1 Polikaprolakton (PCL)

Polikaprolakton (PCL); 1930'larda Carothers ve grubu tarafından sentezlenen bir yapıdır. PCL; anyonik, katyonik ve koordinasyon tepkimeleri kullanılarak ϵ -kaprolaktonun zincir açılımı polimerizasyonu ya da 2-metilen-1-3-dioksepanın serbest radikal zincir açılma polimerizasyonu ile hazırlanır (Şekil 2.4). Biyoyumlu, biyobozunur, hidrofobik ve yarıkristalin bir polimerdir. Kristalinitesi molekül ağırlığının artmasıyla azalma eğilimi gösterir. Bozunma kinetiği, mekanik özelliği, kolay şekil alma ve uygun gözenek boyutlarının elde edilmesi doku onarımı ve ilaç salımı gibi uygulamalarda sıklıkla tercih edilen bir polimer olmasını sağlamıştır. Özellikle kemik doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır. Doku onarımının yanı sıra uzun dönemli implantlarda, kontrollü salım uygulamalarında ve yara örtülerinde uygulama alanı bulmaktadır. Kemik doku için yeterli mekanik dayanıma sahip olmasının yanında uzun süre fiziksel özelliklerini koruyabilmektedir (Woodruff vd. 2010).

PCL; birçok organik çözücüde çözünebilmektedir. Bu çözücülere kloroform, diklorometan, karbon tetra klorür, benzen, toluen, sikloheksanon ve 2-nitropropan örnek verilebilir. Ayrıca aseton, 2-bütanon, etil asetat, dimetilformamit ve asetonitril de düşük çözünürlük gösterirken; alkol, petrol eteri ve dietil eterde çözünmez (Woodruff vd. 2010).



Şekil 2.4.a.PCL'nin polimerizasyon reaksiyonu, b. Kimyasal yapısı

Polikaprolaktonun doku mühendisliğinde pek çok uygulama alanı bulunmaktadır. Kas doku bozukluklarını onarmak için PCL/kollajen nanofiberleri farklı yönelimlerle elektroğirmeyeyle elde edilen çalışmada insan kas hücreleri bu doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiştir. Çalışmanın sonunda tek yönlü nanofiberler rastgele yönelimli nanofiberlerle karşılaştırıldığında tek yönlü olanlarda kas doku hücrelerinin doku onarımını daha iyi gerçekleştirdiği görülmüştür (Choi vd. 2008).

Kıkırdak doku mühendisliği alanında yapılan bir çalışmada 3-B, nanofibröz PCL doku iskelelerinin üzerinde kondrosit hücrelerinin yapışma yeteneği değerlendirilmiştir. Kondrositler nanofibröz PCL doku iskelesi üzerine ekilmiş ve serum içermeyen besi ortamında kültüre edilmiştir. Kondrositlerin PCL doku iskeleleri üzerinde canlılığı ve üremesi incelenmiştir.Yapılan analizler sonucu PCL doku iskelesinin kıkırdak doku mühendisliği açısından uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Li vd. 2003).

Kardiyovasküler doku mühendisliğine yönelik çalışmalarda (Van Lieshout vd. 2005-2006) aortik damar doku mühendisliği için 2 tip PCL doku iskelesi geliştirilmiştir. Bunlardan ilki elektroğirmeyeyle elde edilmiş PCL doku iskelesi diğeri ise örülmüş yapıdaki doku iskelesidir. Bu 2 tip doku iskelesi doku mühendisliği proseslerine göre karşılaştırılmışlardır. Fibrin jel içeren insan miyofibroblastları her iki doku iskelesinin üzerine ekilmiş ve kültüre edilmiştir. Kollajen üretiminde her iki tipte de fark görülmemiş fakat hücrelerin ekilmesindeki durumlar karşılaştırıldığında elektroğirilmiş doku iskelesinde daha etkin olduğu görülmüştür. Elektroğirilmiş

yapının hücre geçirme yeteneği ile örülmüş yapının gücünü kombinleyerek optimal doku iskelesi elde edilebileceği sonucuna varmışlardır.

Deri doku mühendisliğine yönelik çalışmada üretilen PCL/kollajen kompozitleri fibroblastların ve keratinositlerin bir araya gelmesini ve üremesini sağladıklarını görmüşlerdir (Dai vd. 2004).

Schnell vd. (2007)'nin sinir doku mühendisliği ile ilgili çalışmalarında periferel sinir yaralanmasından sonra sinir onarımı için bir yol olarak PCL/kollajen kompozitleri kullanılmıştır. Yapılar elektroğirme ile üretilmiş ve hücre kültürü çalışmalarıyla test edilmiştir. % 100 PCL fiberleri 25:75% PCL/kollajen kompozitleri ile karşılaştırılmıştır. Hücre göçü, sinir taşıyıcısı ve proses oluşumu saf PCL ile karşılaştırıldığında kompozit olan PCL/kollajen yapısında daha düzgün olduğu görülmektedir.

Periodontal onarım amacıyla yapılan çalışmada (Gürbüz vd. 2016) çok tabakalı biyobozunur membranlar elektroğirme ve çözücü döküm/parçacık uzaklaştırma yöntemleriyle elde edilmiştir. Bu membranların üç farklı fonksiyonel özellikte tabakaya sahip olduğu görülmüştür. Bu tabakalar, PCL/nano-hidroksiapatit çekirdek tabaka, PCL/kollajen ve PCL/kollajen-kemik morfojenik protein (BMP-7) çekirdek tabakanın her bir kenarının üzerindeki dış tabakalardır. Yapılan hücre kültürü çalışmaları osteoblastik farklılaşmanın PCL/kollajen-BMP-7'de daha iyi sonuç verdiğini göstermektedir.

2.3.2 Grafen temelli materyaller

Grafen, sp^2 hibritleşmesine sahip tek atom kalınlığında bal peteği şeklinde karbon atomlarından oluşan bir malzemedir. 2-boyutlu bir yapıya sahiptir. Kullanım alanları; enerji teknolojisi, sensörler, kataliz ve biyosensörler ile ilaç yükleme gibi biyoteknolojik alanlardır. Yüksek yüzey alanı, mükemmel elektrik iletkenliği, güçlü mekanik dayanım,

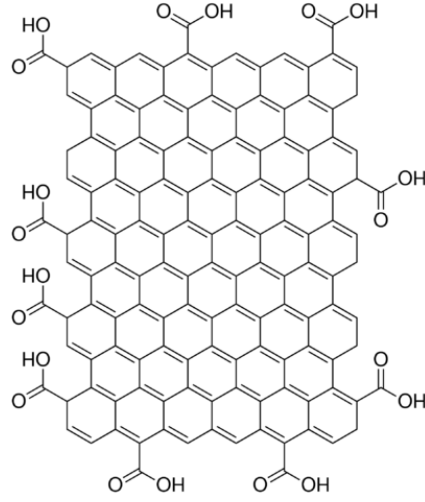
yüksek ısı iletkenlik ve fonksiyonelleşme kolaylığı gibi eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir (Huang vd 2011).

Grafen; grafitin mekanik olarak tabakalarının ayrılmasıyla elde edilebilmektedir. Ayrıca, kimyasal buhar birikimi (CVD) ile de Ni ve Cu yüzeyler üzerinde tek veya birkaç tabaka grafen tabakası oluşturmak için kullanılmaktadır (Yang vd. 2013).

Grafen temelli materyaller eşsiz mekanik özelliklerinden dolayı doku mühendisliği uygulamalarında dikkat çekmektedir. Grafen ve türevleri doku mühendisliği uygulamalarında fiziksel, elektriksel ve mekanik özellikleri geliştirmek için diğer biyomateryallerle kompozit oluşturularak kullanılmaktadır (Shin vd. 2016).

Grafenin başka formları da bulunmaktadır. Bu formları; grafen oksit (GO), indirgenmiş grafen oksit (rGO) ve grafitir (Yang vd. 2013).

Grafen oksit; kimyasal olarak modifiye edilmiş grafenin yüksek derecede oksitlenmiş formudur. Grafit oksidin sonikasyon aracılığıyla uygun sıvı ortamında dağıtılarak tabakalarının ayrılması sonucu oluşur (Şekil 2.5). Kimyasal reaksiyonlar aracılığıyla elektriksel ve optik özellikleri ayarlanabilmektedir. 2-boyutlu bir yapıya sahiptir. Periferik karboksilat grupları koloidal stabilite ve pH'a bağlı negatif yüzey yükü sağlar. Epoksit ve hidroksil grupları temelde yüksüzdür ama zayıf etkileşimlere, H-bağlarına ve diğer yüzey reaksiyonlarına izin verir. Çoğunlukla güçlü mineral asitleri kullanılarak grafitin oksidasyonu ya da Hummers metodu kullanılarak oksitleme ajanları KMnO_4 ve H_2SO_4 ile birlikte muamele edilerek elde edilir. Geniş yüzey alanı, hidrofobik fonksiyonel gruplar gibi eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Son zamanlarda biyomedikal alanında kullanılmaya başlanmıştır. Grafen oksit, π bağı, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler aracılığıyla antikanser ilaçları, genleri ve proteinleri bağlayabilir. Güçlü adsorpsiyon kapasitesi, hücre üretimi ve farklılaşmasında etkili olan moleküllerin grafen oksit yüzeyinde zenginleşmesini sağlar (Yang vd. 2013).



Şekil 2.5 Grafen oksidin kimyasal yapısı (www.mdpi.com, 2017b)

Kalp doku mühendisliğinde ve sinir doku mühendisliğinde grafen temelli materyaller yüksek elektrik iletkenliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Bu materyaller hücresel fonksiyonu büyük ölçüde geliştirmektedir (Shin vd. 2016).

Kemik doku mühendisliğinde grafen temelli materyaller biomineralizasyonu ve hücresel osteojenik farklılaşmayı sağlayarak osteokondüktiviteyi geliştirebilirler (Shin vd. 2016).

İndirgenmiş grafen oksit (rGO); hidrazinle indirgeme durumları altında grafen oksidin termal, kimyasal ve UV işlemleri sonucunda elde edilmektedir.

Grafit; karbon türevli kurşunkalem ve bazı aygıt parçalarının yapımında kullanılan, yumuşak, kolayca toz haline gelebilen, gri siyah renkli ve yapay olarak billurlaşabilen bir maddedir.

2.3.3 Biyanokompozitler

Kompozit malzemeler, nano boyuttan makro boyuta kadar değişim gösteren, birbirlerinden kesin sınırlarla ayrılmış ara yüzey özelliklerine sahip iki veya daha fazla malzemenin biraraya gelmesiyle oluşan malzemeler olarak tanımlanmaktadır (Hoffman vd. 2013). Kompozit malzemeler genellikle bir veya birden fazla sürekli olmayan fazın

(*discontinuous phase*) sürekli bir faz (*continous phase*) içerisine yerleştirilmesiyle elde edilir. Sürekli olmayan faz genellikle sürekli faza göre daha sert ve dayanıklıdır ve güçlendirici malzeme (*reinforcing material*) olarak adlandırılır. Sürekli faz ise matriks (*matrix*) olarak tanımlanır. İnsan vücudunda bulunan hücre dışı matriks tendonlar, ligamentler, deri ve kemik gibi birçok doku kompozit yapıdadır. Kompozit malzemelerin özellikleri malzemeyi oluşturan bileşenlere, dağılımlarına ve ara yüzey etkileşimlerine bağlı olarak değişmektedir.

Matris yapıların nanoboyuttaki fiberler ya da partiküller ile yüklendiği ve katkılandırıldığı kompozitler **nanokompozitler** olarak adlandırılmaktadır (Hoffman vd. 2013). Biyomedikal uygulamalarda ve doku mühendisliği yaklaşımında organik veya inorganik yapıdaki dolgu malzemeleri (güçlendirici malzemeler) biyobozunur malzemeler (matris yapı) ile biraraya getirilerek nanokompozit yapıda malzemeler hazırlanmaktadır. Nanopartiküller ve polimer matris arasındaki ara yüzey yapışması, nanokompozit özelliklerini etkileyen en önemli faktördür (Hong vd. 2005, Borum-Nicholas vd. 2003).

Biyolojik sistemlerle etkileşmek üzere hazırlanan biyonanokompozit yapılarda biyobozunur yapıdaki polimerler en sık kullanılan matris yapılarıdır. Polisakkarit bazlı kitosan, aljinat ve hyaluronik asit gibi doğal polimerlerin yanısıra, poli laktik asit (PLA), polihidroksi bütirat (PHB) ve poli (laktik-ko-glikolik-asit) (PLGA) gibi sentetik polimerler de matris yapı olarak kullanılmaktadır.

Biyonanokompozitlerin hazırlanmasında kullanılan nanoyapılar ise nanohidroksiapatit, metal nanopartiküller ve karbon nanoyapılar olarak sınıflandırılabilir (Armentano vd. 2010).

Hidroksiapatit (HA), insan kemik dokusuna benzer yapıda minerale sahip olduğundan en yaygın kullanılan seramik materyaldir. Ayrıca diş, deri ve kaslarda da *in vitro* ve *in vivo* ortamda biyoyumlu özelliği nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. HA, kemik oluşumuna olanak verecek Ca/P oranına sahiptir. İnorganik-organik kompozitler, polimer fazın sertliği ile inorganik fazın sıkıştırma dayanımını bir arada sağlamayı

amaçlamaktadır. Bu kompozitlerde inorganik partikül olarak kullanılan hidroksiapatitin alkalinitesi PLA gibi degradasyon sonucu asit üreten polimerleri nötralize etmekte ve biyoaktif fonksiyonallığe sağlanmaktadır. HA, kemiğin mineral yapısına ve bileşimine benzerliği nedeniyle klinik uygulamalarda kullanılan bir seramiktir. Bununla birlikte nano-boyuttaki HA artan yüzey alanı ve küçülmüş boyutu ile gelişmiş fonksiyonel özelliklere sahiptir. Mikro yapıli seramik malzemelerle karşılaştırıldığında nano boyutlu HA ile protein adsorpsiyonunun ve osteoblastik hücre yapışmasının arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Woodard vd. 2007).

Metal nanopartiküller, soy metallerin nanopartikül olarak kullanımı son yıllarda büyük ilgi görmektedir. En çok tercih edilen altın, gümüş ve platin gibi soy metaller belirli optik, elektrokimyasal ve elektronik özelliklere sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı boyut ve şekil kontrolünü yapmak açısından avantajlıdır. Metal nanopartiküller biyolojik açıdan bazı özelliklerden yoksun olduğundan polimerlerle nanobiyokompozitleri hazırlanmaktadır (Armentano vd. 2010).

Polimer-altın nanopartikül biyonanokompoziti incelenmiş, yapının eşsiz optik özelliklere sahip olduğu ve kompozitin kullanım alanının genişlemesinde faydalı olduğu görülmüştür (Armentano vd. 2010).

Gümüş metali tıp alanında dezenfekte etme özelliği sayesinde kullanılmaktadır. Gümüş ve türevlerinin birçok tuzları antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Fakat gümüş nanopartikülünün işlenmesi zor olduğundan birtakım kısıtlamalara sahiptir. Bu nedenle biyonanokompozitleri hazırlanmaktadır. Biyobozunur polimer matrisler içinde kullanımı stabilizasyon sorunlarını çözerek kontrollü antibakteriyel etkilere izin vermektedir. Gümüş nanopartiküllerin düşük derişimleri polimer matris içindeki yüzey morfolojisini değiştirmekte ve yüzey pürüzlülüğünü etkilemektedir (Armentano vd. 2010).

Karbon Nanoyapılar; fulleren, karbon nanotüp, karbon nanofiber ve grafen gibi karbon türevli formların keşfinden itibaren nanoteknolojide en çok bilinen malzemelerdir (Armentano vd. 2010).

Karbon nanotüpler, grafenin tek (*tek duvarlı karbon nanotüp*) ya da birden çok tabakası (*çok duvarlı karbon nanotüp*) tarafından oluşturulan silindirik yapılardır. Düzenli geometriye sahip olmaları karbon nanotüplere kompozitler, sensörler ve elektronik cihazlar gibi alanlarda eşsiz mekanik ve elektriksel özellikler sunmaktadır. Karbon nanofiberler, boyları 1 mikronla birkaç milimetre arasında çapları ise 100 nanometreye kadar değişen konik ya da silindirik yapılardır (Armentano vd. 2010).

Karbon nanoyapılar kompozit sistemlerde ara yüz tabakası olarak kullanılmaktadır. Karbon nanoyapının küçük bir miktarının polimerin içinde dağıtılmasının, kompozitin mekanik dayanımında önemli artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Nanokompozit içindeki polimer matrisin fiziksel özellikleri ve performansı çok küçük miktarlarda karbon nanoyapılar eklenerek düzeltilebilmektedir. Kompozit oluştururken polimer matrisle karbon nanoyapı arasında ara yüz oluşturulması gereklidir (Armentano vd. 2010). GO katkılı doku iskelesi materyallerinin doku mühendisliği ve diğer alanlarda birçok uygulama alanı bulunmaktadır.

Grafen, altıgen bal peteği yapısında zincirlerinde reaktif kenarlara sahip olan tek tabakalı iki boyutlu materyaldir. Grafen 2004 yılında grafit yapısından tek atomik tabakanın ayrılmasıyla elde edilmiştir. Bu keşifle birlikte grafen tabakaları eşsiz fiziksel özellikleriyle birlikte kompozitlerin yapısında kullanılmıştır (Armentano vd. 2010).

Grafen oksidin (GO) poli(laktik-ko-glikolik asit)(PLGA) ile kompozit hazırlandığı bir çalışmada PLGA-GO nanofiber doku iskeleleri elektroeğirmeyle hazırlanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşması incelenmiştir. Elektroeğirme tekniğiyle 3-B gözenekli yapıda PLGA-GO nanofiberleri elde edilmiştir. Bu çalışmada GO iki önemli rol oynamaktadır. Bunlardan ilki; hidrofilik performansı geliştirerek fiberlerin adsorpsiyon yeteneğini arttırmaktadır. İkinci görevi de mezenkimal kök hücrelerinin yapışması ve üremesini hızlandırarak osteojenik farklılaşmayı tetiklemektir (Luo vd. 2015).

İndirgenmiş grafen oksit (rGO)/polikaprolakton (PCL) kompozitinin hazırlandığı çalışmada L929 hücreleri kullanılarak hücre kültürü çalışmaları yürütülmüştür.

Mikroskop görüntülerinde hücrelerin doku iskelesi üzerine tutunup üredikleri görülmüştür. Hücrelerin yoğunluğu kültürün dördüncü gününde önemli miktarda artış göstermiş, doku iskeleleri hiçbir toksik etki göstermemiş ve *in vitro* biyouyumluluğunu sağlamışlardır (Murray vd. 2015).

2.4 Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Doku iskelelerinin vücutta hasara uygun biçimde hazırlanabilmesi ve gerekli fiziksel özellikleri içermesi için birçok üretim yöntemleri vardır. Bu yöntemler genel olarak klasik ve gelişmiş yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Klasik yöntemler; fiber bağlama, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma, gaz köpükleştirme, faz ayırma, elektroçirme, dondurarak kurutma, eriyik kalıplama yöntemleridir. Gelişmiş yöntemler ise, hızlı prototip yöntemler, yerinde fotopolimerizasyon, yüksek iç faz emülsiyonu, süperkritik akışkan teknolojisi yöntemleridir.

2.4.1 Doku iskelesi klasik üretim yöntemleri

2.4.1.1 Fiber bağlama

Mikos ve arkadaşları tarafından geliştirilen en eski doku iskelesi üretim tekniğidir. Bu yöntemde poliglolik asit (PGA) fiberleri kullanılmaktadır. PGA kendisini çözmeyen bir çözücüde(kloroform, DCM) çözünmüş PLLA ile karıştırılır. Kompozit materyal oluştuktan sonra çözücü buharlaştırılır. Daha sonra PLLA matris metilen klorür ajanıyla çözülerek uzaklaştırılır. PGA bu çözücüde çözünmediğinden ağ yapısında doku iskelesi elde edilir (Siva vd. 2015).

2.4.1.2 Elektroçirme

Elektrostatik güçler yardımıyla polimer çözeltisinden belli bir yarıçapta fiber elde etmeye dayanan bir tekniktir. Elektroçirme sistemi üç temel bileşenden oluşur. Bunlar, yüksek voltaj güç kaynağı, şırınga ve toplayıcı levhadır. Polimer çözeltisi şırınganın

içine alınır belirli bir kV değerinde voltaj uygulanır. Elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimini aştığı anda fiber şeklinde jet bir akım elde edilir. Oluşan fiberler toplayıcı levhada birikir. Elektroğirme birçok parametreye bağlıdır. Çözücüye bağlı olan parametreler; çözelti derişimi, polimer molekül ağırlığı, çözelti viskozitesi, yüzey gerilimi, çözücünün dielektrik katsayısıdır. Prosese bağlı parametreler de; uygulanan voltaj, toplayıcı türü, toplayıcı-iğne ucu uzaklığı, akış hızıdır. Bu parametreler ayarlanarak istenilen özellikte fiberler elde edilebilmektedir (Bhardwaj ve Kundu 2010).

2.4.1.3 Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma

büyük ekipmanlar gerektirmeyen basit bir yöntemdir. Öncelikle polimerin ilgili çözücüde çözeltisi hazırlanır. Gözenek oluşumunu sağlayacak partiküller eklendikten sonra bir kalıba dökülür. Çözücü buharlaştırılarak yapıdan uzaklaştırılır. Yapıdaki partiküller suda çözünerek ayrılır ve gözenekli yapı elde edilir (Subia vd. 2010).

2.4.1.4 Gaz köpükleştirme

Organik çözücü kullanılmadan doku iskelesi üretimine dayanan bir yöntemdir. Na_2CO_3 veya NaHCO_3 kullanılır bu ajanların yüksek sıcakta bozunmasıyla yapıda çekirdekleşme görülür. Bu çekirdekleşmenin içindeki CO_2 kabarcıklarının çıkmasıyla gözenekli doku iskeleleri elde edilir (Murphy ve Mikos 2007).

2.4.1.5 Faz ayırma

Bu yöntemde doku iskelesi üretimi çözeltinin polimerce zengin ve polimerce fakir faz olarak ayrılması esasına dayanır. Polimer derişiminin düşük olduğu faz polimerce fakirken, polimer derişiminin yüksek olduğu faz polimerce zengin fazdır. Fazların ayrılması sıcaklığın düşürülmesi ile gerçekleşiyorsa termal yolla faz ayrımı, çözücünün buharlaştırılması yoluyla gerçekleşiyorsa çözücü ile gerçekleşen faz ayrımı adını alır (Nam ve Park 1999).

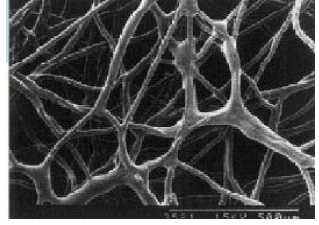
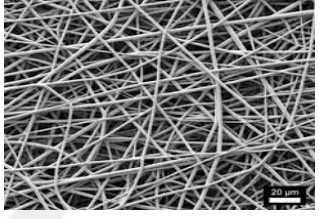
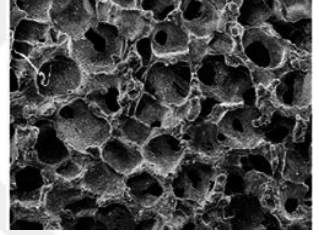
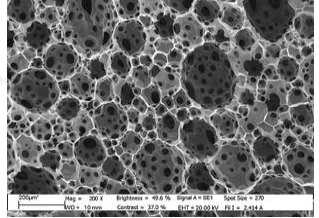
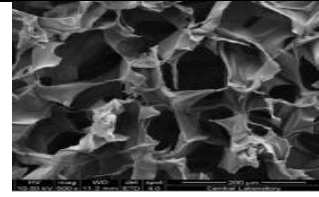
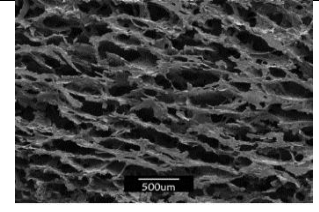

2.4.1.6 Dondurarak kurutma

Bu yöntemde süblimasyon temel alınır. Bu teknikte polimerin ilgili çözücünde çözeltisi hazırlanır ve hızlı bir dondurma işlemi gerçekleştirilir. Daha sonra yüksek vakum altında dondurarak kurutma işlemi yapılır. Dondurma hızı ve Ph'ı kontrol ederek gözenek boyutu ayarlanır. Dondurma hızının çok fazla olması durumunda küçük gözenekler meydana gelir (Murphy ve Mikos 2007).

2.4.1.7 Eriyik kalıplama

Bu yöntemde polimer kalıba doldurulur. Kalıp polimerin camı geçiş sıcaklığının (T_g) üstüne kadar ısıtılır ve basınç uygulanır. Bu işlemle polimer partiküllerinin sıkışarak bir araya gelmesi sağlanır. Kalıp çıkarılır ve doku iskelesi kurutulur. Bu yöntemde kalıbın şekline uygun doku iskeleleri elde edilir (Siva vd. 2015). Yöntemlerin avantaj ve dezavantajları çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3 Doku iskelesi klasik üretim yöntemleri

Üretim Yöntemi	Avantaj[16]	Dezavantaj[16]	SEM Görüntüleri
Fiber Bağlama	Basit işlem, yüksek gözeneklilik ve yüksek yüzey alanı/hacim oranı	Sınırlı polimer tiplerine uygulanabilmesidir	
Elektroçizme	Kontrollü gözenek boyutu, gözeneklilik ve fiber kalınlığı	Sınırlı mekanik özellikler, gözenek boyutunun arttıkça fiber kalınlığının azalmasıdır	
Çözücü Döküm/Parçacık Uzaklaştırma	Kontrollü gözenek, gözenek boyutu ve kristalite	Elde edilen yapılar sınırlı mekanik özelliklere sahiptir ve yapıda atık çözücü ile porojen kalabilmektedir	
Gaz Köpikleştirme	Zararlı organik çözücülerin kullanılmaması, kontrollü gözeneklilik ve biyomoleküllerle birlikte kullanılabilirliği	Sınırlı mekanik dayanım ve yetersiz gözenek bağlantısı	
Dondurarak Kurutma	Gözeneklerin birbiri ile bağlantıları ve gözeneklilik uygundur	Sınırlı gözenek boyutları	
Faz Ayırma	Yüksek gözeneklilik elde edilebilmesi ve biyomoleküllerle birlikte kullanılabilme kapasitesi vardır	Sınırlı gözenek boyutu, çözücü atığı ve mikrogeometrinin tam olarak kontrol edilememesi	
Eriyik Kalıplama	Makrogeometriyi, gözenekliliği ve gözenek boyutunu kontrol etmek kolaydır.	Sıcaklığın artırılması biyomoleküllerin bozunmasına neden olmaktadır	

2.4.2 Doku iskelesi gelişmiş üretim yöntemleri

2.4.2.1 Hızlı prototip yöntemler

Katı serbest form üretim teknikleri olarak bilinir. Bilgisayar programı aracılığıyla doku iskelesinin mikro/makro özellikleri kontrol edilir, boyut ve tasarım parametreleri oluşturulur. 3-B baskılama, stereolitografi, seçici lazer sinterleme örnek verilebilir (Peltola vd. 2008).

2.4.2.2 Yerinde fotopolimerizasyon

Bu yöntem uzun yıllardan beri biyomedikal alanda kullanılmaktadır. Fotopolimerleşen hidrojel *in situ* durumda oluşur ancak kendi kendilerine jelleşemezler. Sıcaklık gibi dış etkenlerle jelleşebilirler. Zincir sonlarında akrilat olan gruplar uygun fotobaşlatıcı altında daha çabuk polimerleşmektedir (Smeds ve Grinstaff 2001).

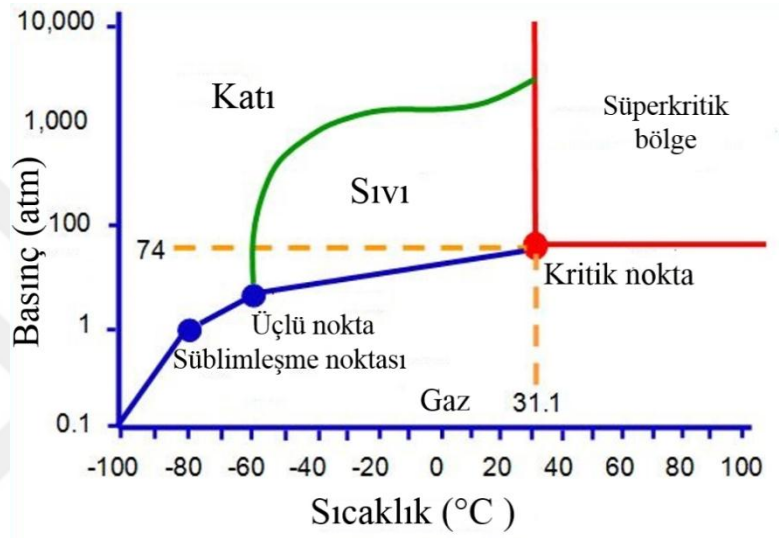
2.4.2.3 Süperkritik akışkan teknolojisi

Süperkritik akışkan teknolojisi yeşil kimya olarak adlandırılan, çevreye zarar vermeyen, yüksek miktarda organik çözücü gerektirmeyen, ucuz, düşük sıcaklıklarda uygulanabilen bir teknolojidir. Ayrıca bu teknolojiyle klasik yöntemlere göre oldukça kısa sürede doku iskelesi üretimi gerçekleştirilebilmektedir.

Klasik yöntemlerin bazıları yüksek sıcaklık gerektirmektedir. Bu durum bazı ilaçların ve biyoaktif malzemelerin yapılarının bozulmasına neden olmaktadır. Diğer bir olumsuz durum ise uygun gözeneklilik ve gözenek boyutu ile 3-B yapıyı sağlamak zordur. Bütün bu durumlardan dolayı süperkritik akışkan teknolojisi son yıllarda ön plana çıkmıştır.

2.4.2.3.1 Süperkritik akışkanlar ve özellikleri

Süperkritik akışkan, sıcaklığı ve basıncı belirli bir kritik değerin üzerinde olan akışkanlardır (Şekil 2.6). Yoğunluklarından dolayı sıvılara viskozite ve yayınlıklarından dolayı da gazlara benzediğinden ‘akışkan’ kavramı olarak verilmektedir (Girard vd. 2016) (Çizelge 2.4).



Şekil 2.6 Süperkritik akışkanların faz diyagramındaki yeri (www.researchgate.net, 2017c)

Çizelge 2.4 Sıvılar, gazlar ve süperkritik akışkanların yoğunluk, yayınlık ve viskozite değerlerin karşılaştırılması

Özellikler	Gaz	Süperkritik Akışkan	Sıvı
Yoğunluk ($g L^{-1}$)	0.6-2	100-1000	600-1600
Viskozite ($\mu Pa s$)	10-50	10-30	200-3000
Yayınlık ($m^2 s^{-1}$)	10000	10-100	0.2-2

Birçok madde süperkritik akışkan olarak kullanılmaktadır. Bu maddeler çizelge 2.5’de verilmiştir.

Çizelge 2.5 Süperkritik akışkan olarak kullanılan bazı maddelerin kritik sıcaklık ve basınç değerleri

Akışkan	Kritik sıcaklık (T_c)	Kritik basınç (P_c)
Argon	-122.3	48.0
Aseton	235.1	47.6
Etan	32.3	48.2
Karbondioksit	31.1	72.8
Metan	-82.1	45.8
Su	374.1	218.3
Propan	96.7	41.9

Çizelge 2.5'deki maddelerden en fazla kullanılanı CO_2 'dir. CO_2 'in avantajları sayılacak olursa; toksik değildir, kolay alevlenmez, maddelerden tamamen uzaklaştırılması mümkündür, düşük reaktivite gösterir, oksidasyona karşı inerttir, ısı ve kütle aktarımı düşük yoğunluk ve viskoziteden dolayı fazladır. Dezavantajları ise, düşük bağlanma enerjisine ve yoğunluğuna sahip olmasıdır. CO_2 , Lewis asidi özelliği göstermektedir. Birincil ve ikincil aminler gibi güçlü Lewis bazlarıyla tersinir olarak tepkime verir. Bu bazı maddeler için olumsuz özellik ortaya çıkarırken, amin bazlı çözücüler, sürfaktanlar ve polimerler için avantajlı olabilmektedir (Girard vd. 2016).

CO_2 ; iyonik ve polar bileşenler için zayıf bir çözücüdür. Çünkü apolar ve aprotik özellik gösterir. Aprotik çözücüler, hidrojen atomlarına sahiptirler ancak O-H ve N-H gibi hidrojen bağları oluşturamayan çözücülerdir. Apolar çözücüler ise; (+) ya da (-) kutba sahip olmayan kutupsuz çözücülerdir. Bu yüzden yeşil, protik ve polar çözücü eklenmesi CO_2 ile az karışma özelliği göstermesine neden olabilir (Girard vd. 2016).

CO_2 ; polimerlerin içindeki yüksek yayınlığından dolayı erime sıcaklığını (T_m) ya da camsı geçiş sıcaklığını (T_g) azaltarak polimerin erime viskozitesini düşürür. Polimerin morfolojisi ve molekül yapısı CO_2 'in yayınlığını etkiler. CO_2 ile etkileşim kuran polimerin kenar zincirlerindeki eter ya da karbonil grupları polimerin içinde karbondioksitin difüzyonuna yardım eder (Girard vd. 2016).

Yapısal engel de polimerin içinde CO₂'in yayınlılığını etkileyebilir. Örnek olarak; PLA ve PLGA aynı kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen, CO₂'in çözünürlüğü PLA'da PLGA'ya göre daha yüksektir. Bu nedeni serbest hacimdir. **Serbest hacim**; polimerin kırılğan yapıdan yumuşak yapıya geçebilmesi için polimer zincirlerinin kendi etraflarında eğilip-bükülme hareketlerini yapabilmeye yetecek hacme sahip olmasıdır. PLGA'da PGA içeriğinin artması CO₂'in çözünürlüğünü azaltır. PCL gibi yüksek kristalin moleküllerde T_g ya da T_m'nin altındaki sıcaklıklarda CO₂ düşük yayınlılık gösterir (Girard vd. 2016).

CO₂; apolar ve bazı polar düşük mol kütleli maddeler için iyi bir çözücüyken, yüksek mol kütleli maddeler için zayıf bir çözücüdür. Belirli amorf floropolimerler ve silikonlarda için de istisna olarak iyi bir çözücü özelliği gösterir. Florlu polimerlerin önemli çözünürlük özelliği yapılarındaki C-F bağının CO₂ ile etkileşiminden dolayıdır. Ayrıca esnek Si-O-Si bağları da siloksan polimerlerin çözünürlüğünden sorumludur (Girard vd. 2016).

Polimerlerin kutupluluğu yayınlılığı sınırlandırır. Çünkü CO₂, kuadropol momente sahiptir yani 4 kutba sahiptir ve bu yüzden kalıcı dipolü yoktur. Ayrıca CO₂, hem Lewis asidi hem Lewis bazı gibi davranır. Teorik ve deneysel kanıtlar göstermektedir ki; CO₂, H-bağı etkileşimlerine katılabilir. CO₂, spesifik çözücü-çözünen etkileşimleriyle dipolar ve non-dipolar molekül sistemlerinde çözünebilir (Girard vd. 2016) .

2.5 Süperkritik Akışkan Kullanılarak Doku İskelesi Elde Etme Yöntemleri

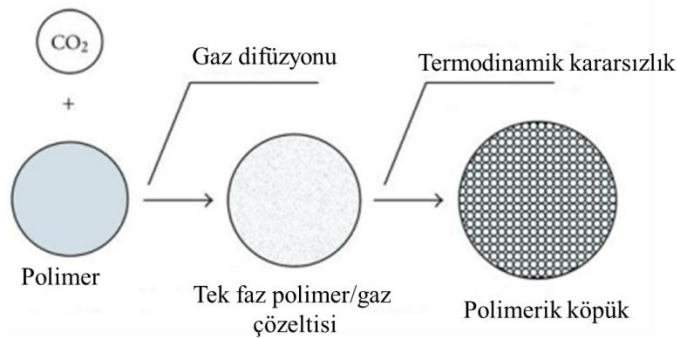
2.5.1 Gaz köpükleştirme yöntemi

Klasik köpüklenme tekniğinde gaz fazındaki bileşikler kullanılan bazı kimyasal ajanlarla oluşturulur. Bu gaz bileşikler yapıda gaz kabarcığı oluşmasından sorumludur. Bu prosesin temeli, proses parametrelerini optimize ederek gözenek çapının kontrolünü sağlamaktır.

Süperkritik akışkan yöntemiyle gaz köpükleştirmede temel gereksinim, CO₂'nin polimerin içine yeterli miktarda difüzyonudur. Klasik yöntemle karşılaştırıldığında bu yöntem daha büyük kütle aktarım katsayısıyla ve sıcaklık/basınç parametrelerinin optimize edilip polimerin içinde difüzenen CO₂'in ayarlanabilmesiyle karakterize edilir. Ayrıca bu proses çözücü kullanımını gerektirmez.

Prosesin ilk basamağında polimer, SK-akışkanla yüksek basınçta doyurulur. Bu doyurma işlemi T_g'yi azaltarak plastikleşmeyi sağlar. Polimerin T_g'sinin azalması polimer-CO₂ arasındaki moleküller arası etkileşimin sonucudur. Polimer/gaz karışımı basınç azaltılarak ya da sıcaklık artırılarak süper doymun duruma getirilir. Bu işlem sırasında termodinamik olarak kararsızlık meydana gelir ve yapı içinde kabarcık oluşumu ve kabarcık çekirdeklenmesi görülür. Kabarcık gelişimi ve çekirdeklenmesi için yürütücü güç T-T_g sıcaklık farkıdır. Bu da doğrudan örneğin ısıtılması ya da basınç aracılığıyla T_g'nin ayarlanmasıyla yapılır. Prosesin son kısmında sistemin sıcaklığı azaltılıp, basınç değiştirilerek polimer sertleşir, kabarcık çekirdeklenmesi görülen yapıdan gaz uzaklaşır ve gözenekli doku iskelesi oluşur (Şekil 2.7). CO₂'e afinitesi fazla olan amorf ve yarı kristalin polimerlere uygulanır.

Uygulanması kolay bir proses olup çözücü kullanımı gerektirmemesi bu yöntemin avantajıdır. Diğer yandan yüksek hacim artışından dolayı örneğin boyutlarını ve şeklini kontrol etmek kolay değildir. İşlem sonunda gözeneksiz yapılar oluşabilmektedir.



Şekil 2.7 Süperkritik CO₂ destekli gaz köpükleştirme yönteminin şematik gösterimi

Süperkritik CO₂ destekli gaz köpükleştirmeyle ilgili bir çalışmada (Gualandi vd. 2009) w-pentadecalakton- ε-kaprolakton kopolimerleri (PDL-PCL) kullanılmıştır. Basınç 230 bar, sıcaklık 90 °C parametreleri 20 dk süreyle uygulanmıştır. Araştırmada gözenek boyutu ve mekanik dayanım açısından kıkırdak doku mühendisliğinde kullanım alanı olabileceği sonucuna varmışlardır.

Hidroksiapatit (HA) ve β-trikalsiyum fosfat (β-TCP) ile PLA polimeri kullanılan bir çalışmada (Mathieu vd. 2006) işletme parametreleri olarak basınç 100-250 bar, sıcaklık 195 °C olarak ayarlanmıştır. Proses süresi de 10 dk olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak HA'nın eklenmesiyle β-TCP'den daha heterojen köpükler elde edildiği görülmüştür. Seramik partikülleri gözenek duvarlarında dağılmıştır. Bu da matrisin etkili bir şekilde güçlenmesini sağlamıştır. HA'nın eklenmesiyle gözenek boyutu 200µm'den 400 µm'ye, gözeneklilik % 78'den % 92'ye çıkmasıyla sıkıştırma modülü 250 MPa olduğu görülmüştür. Bu doku iskelesinin kemik doku mühendisliğinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

PCL, termoplastik zein ve hidroksiapatit (HA) kullanılarak süperkritik CO₂ (skCO₂) destekli gaz köpükleştirme yöntemiyle doku iskeleleri üretilmiştir (Salerno vd. 2010). Çalışmada materyallerin oluşumu, bileşenlerin karıştırılması ve köpüklenme parametreleri optimize edilerek mikro yapısal özellikleri ve *in vitro* olarak doku iskelelerinin bozunması kontrol edilmiştir. Kompozit doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımları ve sıkıştırma özelliklerinin kemik doku mühendisliğine uygun olduğu sonucuna varılmıştır. *In vitro* hücre/doku iskelesi etkileşiminin osteoblastların adhezyonuna ve kolonizasyonuna izin verdiğini gözlemlemişlerdir.

Polistiren/grafen oksit (GO) kompozitinin skCO₂ destekli gaz köpükleştirmeyle elde edildiği çalışmada (Yang vd. 2011) GO, dimetilformamid (DMF) çözücüsünün içinde dağıtılmış daha sonra polistirenle karıştırılmıştır. Kompozitle sadece polistirenle yapılan çalışma karşılaştırıldığında bu yöntemle birlikte kompozit materyalde daha küçük hücre boyutu ve daha fazla hücre yoğunluğu görülmüştür. GO tabakalarının heterojen çekirdekleşme ajanı gibi davrandığını görmüşlerdir.

2.5.2 Faz ayırma yöntemi

Klasik faz ayırımı yönteminde polimer ve çözücü termodinamik olarak kararsız olduğundan sistem iki faz oluşturma eğilimi gösterir. Bu fazlar; polimerce zengin faz ve polimerce fakir fazdır. Çözücünün uzaklaştırılması sırasında polimerce zengin faz katılaşır.

Faz ayırımı iki yolla olmaktadır. Bunlardan ilki termal yolla faz ayırımı diğeri ise çözücüyle faz ayırımıdır. En yaygın kullanılanı polimer çözeltilisinin inert bir desteğe yani bir kalıba döküldüğü çözücüyle gerçekleşen faz ayırımıdır. Bu çözeltiliye daha sonra polimerin çözünmediği ancak polimer çözücüsüyle karışabilen ikinci bir çözücü eklenir. İki çözücü arasındaki temas sonrası faz ayırımı meydana gelir. Proses koşulları uygun seçilirse, mikrometrik gözenek yapıları oluşur.

Bu yöntemin süperkritik olarak modifikasyonunda ikinci çözücü olarak SK-CO₂ kullanılır. skCO₂; üstün kütle aktarım özelliklerinden polimer hızlıca kurutur. Çözücüü tamamen ekstrakte etmek için polimerin çözünebildiği kadar çözücü kullanıldığından herhangi bir ek işlem gerektirmez. Çözücü skCO₂ ile karışabildiği için çözücüü geri kazanabilmek kolaydır. skCO₂ prosesi, sıcaklık ve basıncı değiştirerek gözenek boyutları ile yapı morfolojisini ayarlamaya olanak tanır. Prosesin ilgili parametreleri; sıcaklık, basınç, polimer derişimi ve çözücü çeşididir.

Süperkritik destekli faz ayırımı; filtrasyon prosesleri, kontrollü ilaç salımı ve kataliz gibi birçok uygulamalarda kullanılır.

Süperkritik destekli faz ayırma yöntemiyle yapılan çalışmada (Tsivintzelis vd. 2007) PLLA polimeri diklorometan çözücüsünde çözülmüş, işletme parametreleri olarak 100, 165, 230 bar basınç ve 45 °C sıcaklık ayarlanmıştır. İşletme süresi de 2.5 saat olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda 100'den 230 bara basınç arttırıldığında gözenek boyutunun azaldığı görülmüştür. Sıcaklıktaki azalma ya da basınçtaki artış CO₂'in çözücü gücünü ve yoğunluğunu arttırmıştır.

Polimer olarak kitosanın kullanılıp faz ayrımı yönteminin uygulandığı bir çalışmada (Duarte vd. 2012) işletme basıncı 150 bar ve sıcaklık 60 °C olarak ayarlanmıştır. Proses süresi de 45 dk olarak belirlenmiştir. Çözücü olarak formik asit, asetik asit ve HFIP kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda formik asit kullanıldığında % 29 gözeneklilik, 62 µm gözenek boyutu; asetik asit kullanıldığında % 47 gözeneklilik, 110 µm gözenek boyutu ve HFIP kullanıldığında % 90 gözeneklilik, 600µm gözenek boyutu elde edilmiştir. Bu araştırma sonucunda farklı çözücüler kullanılarak istenilen gözeneklilik ve gözenek boyutunun ayarlanabileceği sonucuna varılmıştır. İlaç salım uygulamaları, kemik ve kırık doku mühendisliğinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

2.5.3 Jel kurutma yöntemi

Klasik olarak jel kurutma, hücre dışı matris üretebilecek nanofibröz birbiri ile bağlantılı yapılar elde etmeye olanak tanır. Ancak jel tek başına doku iskelesinde hücre gelişimi ve difüzyonunu sağlayacak büyüklükte makro gözenek yapısını sağlayamamaktadır. Bu yüzden katı parçacık ekstraksiyonu; kontrollü gözenek boyutu ve gözenekliliği sağlayacak doku iskelelerini elde etmek için işleme dahil edilir.

Jel kurutma prosesi beş adımdan oluşmaktadır. İlk olarak polimer organik çözücüde çözülür. İkinci adımda faz ayrımı/jelleşme görülür. Üçüncü adımda su kullanılarak jelden çözücünün ekstraksiyonu sağlanır. Son adımda ise vakum altında dondurarak kurutulur.

Bu yöntemde doku iskeleleri üretilirken pek çok avantaj görülmektedir. Bu avantajlar kontrollü gözenek boyutu ve % 90'ın üzerinde gözenekliliktir. Bunlar haricinde gözeneklerin büyük yüzey alanı ve gözeneklerin birbiriyle içsel bağlantılı olması da avantajları arasındadır. Fakat bu yöntemin avantajlarının yanında kısıtlamaları da vardır. Bir haftadan daha fazla süren zaman alan bir prosesdir. Kullanılan organik çözücünün yapıdan uzaklaştırılması zordur. Son olarak da kurutma prosesi sırasında organik çözücünün yüzey geriliminden dolayı 3-B yapıyı korumak zordur.

Süperkritik destekli jel kurutma yönteminde skCO₂ , basit ve etkili adımla organik çözücü ekstre etmek için kullanılır. Süperkritik prosesi klasik yöntemle karşılaştırıldığında daha kısa sürede (8 saat) gerçekleşir ve daha az çözücü atığı bulunur (<5ppm). Süperkritik proseste kurutma hızlı gerçekleştiğinden daha az yüzey gerilimi oluşur ve yapının bozulmasının önüne geçilir.

2.5.4 Süperkritik akışkan emülsiyon kalıplama yöntemi

Gözenekli doku iskelesi üretmek için CO₂'in kullanılmadığı klasik yöntemlerde su-yağ emülsiyon sistemleri kullanılmaktadır. Çok çeşitli gözenekli hidrofilik doku iskeleleri bu teknikle hazırlanabilmektedir. Son gözenekli ürün ise, emülsiyon olan iç fazın çıkarılmasıyla geri kazanılmaktadır. Bu teknik yağ yerine skCO₂-su emülsiyonlarına da uygulanabilmektedir. Perfloropolieter sürfaktanları ve polivinilalkolün akrilamid polimerlerinin CO₂-su emülsiyonlarını stabilize etmek için kullanıldığı çalışmada (Butler vd. 2001) polimerizasyondan sonra CO₂'in yapıdan çıkarılması polimer doku iskelesinde birbiri ile bağlantılı gözeneklerin oluşumuna neden olmuştur. CO₂ iç fazının hacim kesrinin artmasıyla gözenekliliğinin arttığını görmüşlerdir. Sürfaktanın derişiminin artmasıyla da daha birbiri ile bağlantılı ve açık gözenekli yapıların elde edildiği gözlenmiştir.

2.5.5 Süperkritik destekli elektroğirme

Klasik elektroğirme yönteminde biyomalzemeler ve onların kompozit malzemelerinden polimerik fiberlerin üretimi için kullanılan yöntemdir. İğneye alınan polimer çözeltisinden fiber üretilmesi için bir elektrik alan kullanılır. İşlem sonunda mikroölçekli fiberler elde edilir.

skCO₂ polimerler için şişme ajanı olarak kullanılır. Polimerin ilaçlar ve biyoaktif bileşenler gibi katkılarla doyurulmasına yardım eder. CO₂; farklı yarıçapta fiberler ve organik çözücü kullanmadan açık gözenek yapısında doku iskelesi üretiminin avantajını

sunar. Ayrıca fiberlerle birlikte ısıya duyarlı bileşenlerin ve canlı hücrelerin kapsüllenmesine olanak tanır.

Organik çözücü kullanmadan $scCO_2$ kullanarak sadece elektrostatik kuvvetlerle fiber elde edilen çalışmada (Levit ve Tepper 2004) yeni süperkritik destekli elektroğirme tekniğini büyük ve küçük yarı çaplı fiberler üretmek için yararlı bir teknik olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sıkıştırılmış akışkan anti çözücü tekniği (PCA) ile klasik elektroğirme tekniğinin birleştirildiği çalışmada (Liu vd. 2010) mikron ve mikron altı boyutlarda düzgün fiberler elde edilmiştir. Süperkritik CO_2 'i sıkıştırılmış akışkan olarak kullanmışlardır. Bu teknikte CO_2 basıncını ayarlayarak farklı fiber morfolojileri elde etmek olanaklıdır. Ayrıca 100 barın çok üstünde bir basınç artışına da ihtiyaç olmadığını görmüşlerdir. İlimli sıcaklık ve basınç koşulları sağlandığı için canlı hücrelerin kapsüllenmesi için de sorun oluşturmayacağı gözlemlenmiştir.

2.5.6 CO_2 kullanılarak hidrojel köpükleştirme

Hidrojeller; hidrofilik polimer zincirleri içerdiği için yüksek miktarda su içeren polimerik malzemelerdir. Çeşitli kimyasal bağlar tarafından oluşturulan polimer zincirleri arasındaki bağlantılar ve fiziksel etkileşimler hidrojellerin yapısal olarak bir araya gelmesine olanak tanır.

Kitin hidrojelleriyle süperkritik CO_2 soğurma mekanizmasını araştırıldığı çalışmada (Tsioptsias ve Panayiotou 2008) kitin jelleri; kitinin adimetilasetamitte çözünmesiyle hazırlanmıştır. Jelin tam anlamıyla oluşumu oda sıcaklığında gluteraldehit buharına maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Jelden CO_2 'in soğurulması; hidrojin suyun içinde çözünmesinden dolayı oluşmaktadır. Hidrojin köpüklenmesi basıncın düşürülmesi sırasında görülmektedir. Çalışmanın sonucunda basınç düşürüldükten sonra dondurarak kurutulan örneğin köpüklenme prosesi sırasında ilk gözenekli yapının korunmasına yardım ettiği görülmüştür.

Elastin temelli hidrojeller üzerinde skCO₂ köpüklenmesinin etkisinin araştırıldığı çalışmada (Annabi vd. 2009) karbondioksitin basıncı 30 bardan 150 bara arttırıldığında hidrojel köpüklenme oranının % 60 arttığı görülmüştür. Ayrıca örnekteki gözeneklerin makro ve mikro yapısında önemli değişikliklere neden olan koaservasyonu hızlandırmıştır. Basıncın arttırılması duvar kalınlığının ve gözenek boyutlarının azalmasına neden olmuştur. Bu elde edilen elastin hidrojel yapısı fibroblast penetrasyonu ve çoğalmasını teşvik etmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu kısımda tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmalar açıklanmıştır. Öncelikle tez süresince kullanılan kimyasal maddeler verilmiştir. Daha sonra doku iskelelerinin üretiminde uygulanan yöntem ve deneysel parametreler açıklanmıştır. Doku iskelelerinin istenilen özelliklere uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları (Taramalı Elektron Mikroskobu, Raman Spektroskopisi, Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi, X-Işınları Kırınımı ve Transmisyon Elektron Mikroskobu) açıklanmıştır. Son olarak doku iskelelerinin toksik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla *in-vitro* koşullarda yürütülen hücre canlılığı çalışmalarına yer verilmiştir.

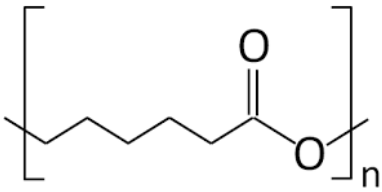
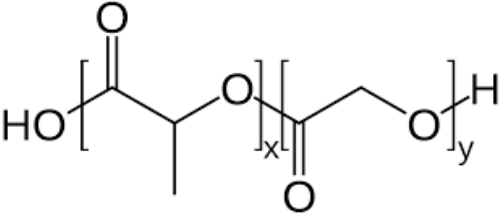
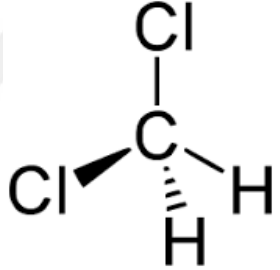
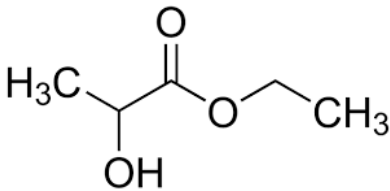
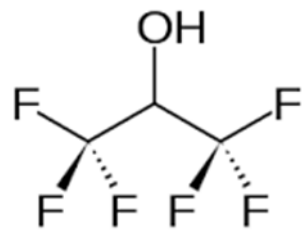
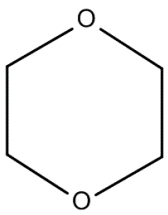
3.1 Materyal

Tez çalışması kapsamında polimer olarak kullanılan polikaprolakton (PCL, M_n : 70,000-90,000) (CAS 24980-41-4) ve poli(laktik-ko-glikolik) asit (PLGA, M_n : 50,000-75,000), (CAS 26780-50-7) Sigma Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Grafit oksit, Grafen (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Çözücü olarak kullanılan etil laktat (EL, CAS 687-47-8), 1,1,1,3,3,3 hekza-floro-2-propanol (HFIP, CAS 920-66-1) ve diklorometan (DCM, CAS 75-09-2) % 99 saflıkta Sigma Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Yine çözücü olarak kullanılan 1,4 diokzan (Index no: 603-024-00-5) Merck firmasından temin edilmiştir. Kullanılan kimyasalların yapıları çizelge 3.1’de sunulmuştur. Gözenekli yapı oluşturmak için kullanılan sodyum klorür (NaCl) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Dulbecco’s fosfat tampon çözeltisi ve besi ortamı için gerekli malzemeler Dulbecco’s Modified Eagles Medium ve fetal sıgır serum Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Antibiyotik olarak kullanılan penisilin streptomisin Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Gluteraldehit ise Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre üremesini takip etmek için kullanılan 3-[4,5-dimethylthylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromür (MTT) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Doku iskelelerinin sterilizasyonu için % 99

saflıkta etanol Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Absorbans okumada kör çözeltiler olarak kullanılan izopropanol Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Çizelge 3.1 Doku iskelelerinin sentezinde kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Kullanım Gerekçesi	Kimyasal Yapı
Polikaprolakton (PCL)	Polimer	
Poli(laktik-koglikolik)asit (PLGA)	Polimer	
Diklorometan (DCM)	Çözücü	
Etil Laktat (EL)	Çözücü	
1,1,1,3,3,3 Hekza-floro-2-propanol (HFIP)	Çözücü	
1-4 Dioksan	Çözücü	

3.2 Yöntem

Tez çalışması kapsamında süperkritik karbondioksit ortamında grafen oksit katkılı PCL ve PLGA doku iskeleleri faz ayrımı ve partikül uzaklaştırma yöntemiyle elde edilmiştir. Bu kısımda yöntem ve uygulanan parametreler açıklanmıştır.

3.2.1 Süperkritik akışkan ortamında faz ayrımı ve partikül uzaklaştırma yöntemiyle doku iskelelerinin üretimi

3.2.1.1 Grafen oksit içermeyen doku iskelelerinin sentezi

Poli(laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) doku iskelelerinin üretilmesi amacıyla öncelikle polimerin ağırlıkça % 15 (w/v) olacak şekilde DCM çözücüsünde 24 saat çözünmesi sağlanmıştır. Bu işlemin sonunda % 8 (w/v) oranında NaCl ilave edilmiştir. 1 saat boyunca NaCl'nin karışması sağlandıktan sonra karışım 1 cm çapındaki teflon kalıplara dökülerek süperkritik CO₂ reaktörüne (Thar R100, ABD) yerleştirilmiştir. Ardından sistem istenilen sıcaklık ve basınç koşullarına (Çizelge 3.2) getirilerek süperkritik CO₂'in çözeltiye difüzyonu sağlanmıştır. Bu işlemden sonra sürekli işletim koşullarında süperkritik CO₂ akışı gerçekleştirilerek çözücü tamamen uzaklaştırılmıştır. Yapıdaki tuzun uzaklaştırılması amacıyla doku iskeleleri 24 saat süre ile saf su içerisinde yıkama işlemine tabi tutulmuştur.

Polikaprolakton (PCL) doku iskelelerinin faz ayrımı yöntemiyle üretimi amacıyla farklı çözücü ve çözücü sistemleri kullanılmıştır. Öncelikle PCL'nin ağırlıkça % 15 (w/v) olacak şekilde uygun çözücülerde 24 saat süre ile çözünmesi sağlanmıştır. Ardından polimer ağırlığının 8 katı olacak şekilde NaCl eklenmiş ve 2 saat süreyle karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda alınan karışım 1 cm çapındaki teflon kalıplara dökülerek süperkritik CO₂ cihazının reaktörüne (Thar R100, ABD) yerleştirilmiştir. Sistem istenilen sıcaklık ve basınç koşullarına getirilerek (Çizelge 3.2) süperkritik CO₂'in çözeltiye difüzyonu sağlanmıştır. Bu işlemden sonra sürekli işletim koşullarında süperkritik CO₂ akışı gerçekleştirilerek çözücünün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yapıdaki tuzun uzaklaştırılması amacıyla doku iskeleleri

48 saat süre ile saf su içerisinde yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen gözenekli doku iskeleleri dondurarak kurutma cihazında (Christ, Almanya) 24 saat süre ile kurutulmuştur.

Çizelge 3.2 Grafen oksit içermeyen doku iskelelerinin sentezine ilişkin koşullar

Polimer (w/v)	Çözücü	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	SK-CO ₂ akış hızı (g/dk)	SK-CO ₂ difüzyon süresi (dakika)	SK-CO ₂ çözücü uçurma süresi (dakika)
PLGA (% 15)	DCM	35	150	5	120	120
PCL (% 15)	1,4-Diokzan	35	150	5	150	150
	HFIP	35	150	5	150	150
	DCM	35, 45	150, 165	5	120, 150	120, 150
	EL	35	150	5	150	150
	DCM/EL	35	150	5	150	150

3.2.1.2 Grafen oksit katkılı polikaprolakton doku iskelelerinin hazırlanması

Grafen oksit katkılı PCL doku iskelelerinin (PCL-GO) hazırlanmasında süperkritik CO₂ ortamında faz ayrımı ve partikül uzaklaştırma yöntemi uygulanmıştır. PCL'nin % 15 (w/v) olacak şekilde EL, DCM veya DCM/EL çözücülerinde 24 saat süre ile çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra grafit oksidin (% 1 ve % 3, w/w) ilgili çözücüdeki karışımı (EL veya DCM) hazırlanarak tabakalarına ayrılıp grafen okside dönüşmesi sağlanmıştır. Bu amaçla 1 saat ultrasonik banyoda (Elma, Elmasonic S70H, 220-240V, 750W, Almanya) bekletilmiş sonrasında PCL çözeltilisine eklenmiştir. PCL-GO karışımları 24 saat süre ile karıştırılmış, ardından polimer ağırlığının 8 katı olacak şekilde NaCl eklenmiş ve 2 saat süreyle karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda alınan karışım 1 cm çapındaki ve 0.6 cm yüksekliğindeki teflon kalıplara dökülerek süperkritik CO₂ cihazının reaktörüne (Thar R100, ABD) yerleştirilmiştir. Ardından sistem istenilen sıcaklık ve basınç koşullarına getirilerek (165 bar ve 35 °C) süperkritik CO₂'in 150 dakika süresince çözeltiliye difüzyonu sağlanmıştır. Bu işlemten sonra sürekli işletim koşullarında süperkritik 5 g/dk akış hızında CO₂ akışı gerçekleştirilerek 150 dakika süresince çözücünün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından yapıdaki tuzun uzaklaştırılması amacıyla doku iskeleleri 48 saat süre ile saf su içerisinde

yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen gözenekli doku iskeleleri dondurarak kurutma cihazında (Christ, Almanya) 24 saat süre ile kurutulmuştur .

3.3 Karakterizasyon Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında hazırlanan polikaprolakton ve polikaprolakton/grafen oksit doku iskelelerinin yapısal ve kimyasal karakterizasyonu aşağıda açıklanan yöntemler ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 Taramalı elektron mikroskobu ile analiz (SEM)

Doku iskelelerinin morfolojik analizi ve gözenek boyut tayini SEM analizi ile (QUANTA 400F Field Emission) yapılmıştır. Doku iskeleleri vakum ortamında altın-palladyum tabakası ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri alınmıştır. Gözenek boyut tayini ise Jmicrovision (USA) programı ile yapılmıştır.

3.3.2 Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR-ATR Analizi)

Doku iskelelerinin kimyasal bağ yapılarının analizleri FTIR-ATR cihazı (Thermo Scientific Nicolet 6700) ile gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar $4000-730\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında değerlendirilmiştir.

3.3.3 Raman spektroskopisi

Doku iskelelerinin yüzey kimyasının incelenmesi için raman spektroskopisi (Renishaw InVia, United Kingdom) analizi yapılmıştır. Analizler 532 nm lazer kullanılarak 500-3000 nm tarama aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.3.4 X-ışınları kırınımı (XRD)

Grafen oksidin PCL doku iskelesinin yapısına katılıp katılmadığının belirlenmesi amacıyla X-ışınları kırınımı (XRD, Rigaku Ultima-IV) analizi yapılmıştır. Analiz, tarama aralığı 3-50 derece, tarama hızı 0.5 derece/dk koşullarında ve 40 kV, 30 mA Cu-K α radyasyon kaynağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.5 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Grafen oksidin tabakalarına ayrılıp ayrılmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Numune hazırlama işleminde 1 mg GO 5 mL etil laktat (EL) çözücü içerisinde sonikasyon aracılığıyla dağıtılmıştır. TEM analizi için kullanılan gridlerin üzerine damlatılarak çeker ocak altında kurutulmuştur. Çözücü tamamen uzaklaşıp gridin üzerinde sadece GO kaldığında TEM analizi gerçekleştirilmiştir.

3.3.6 Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)

Doku iskelelerinin termal özelliklerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. DSC analizinde (Diamond DSC CT,USA) enerji akışındaki değişiklikler ölçülmüştür. Yaklaşık 5 mg ağırlığındaki PCL ve PCL-% 3GO doku iskeleleri alüminyum toplayıcı kaba yerleştirilmiş ve PCL'nin camsı geçiş sıcaklığı olan 60 °C'ye ısıtılmıştır. Son olarak sıcaklık dakikada 10 °C azaltılarak 0 °C'ye düşürülmüştür.

3.3.7 *In-vitro* hücre kültürü çalışmaları

3.3.7.1 Hücre canlılığı tayini

PCL ve PCL-GO doku iskelelerinin üzerinde kültüre edilen hücrelerin canlılığı, MTT testi aracılığıyla mitokondri dehidrojenaz aktivitesi ölçülerek değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı tayininde L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücreler % 10 FBS ve % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM ortamında kültüre edilmiştir. Doku iskeleleri

24 saat süreyle hacimce % 70'lik etanolde sterilize edilmiş ve etanolü uzaklaştırmak için steril Dulbecco's PBS (DPBS) ile 3 kez yıkanmıştır. 24 gözlü petri kapları steril parafilmle kaplanmış ve doku iskeleleri bu gözlere yerleştirilmiştir. Her bir doku iskelesinin üzerinde 5×10^5 yoğunlukta hücre ekilmiştir. 1 mL besi ortamı eklenmeden önce 1 saat hücrelerin yüzeye tutunmaları için beklenmiştir. Taze besi ortamı her 2 günde bir yenilenmiş ve MTT testi 1., 3. ve 5. günlerde uygulanmıştır. Bu aşamada besi ortamı uzaklaştırılıp 60 µL MTT ve 600 µL serum içermeyen besi ortamı eklenmiştir. Hücreler 37 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra çözelti uzaklaştırılmış ve metabolik olarak aktif hücreleri gösteren formazan kristallerini çözmek için her doku iskelesinin üzerine 0.04M HCl'de hazırlanan 400 µL izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Optik yoğunluk ELISA microplate okuyucuda (Rayto, RT2100C,Kore) 570 nm'de ölçülmüştür.

3.3.7.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Doku iskelelerinin üzerinde L929 fare fibroblast hücrelerinin morfolojilerini gözlemek için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürünün 5. gününde doku iskeleleri DPBS ile yıkanmış ve oda sıcaklığında 30 dakika % 2.5 gluteraldehit ile inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra hücreler DPBS ile 2 kez yıkanmış ve her biri 15 dk süresince etanol serilerinde (% 30, % 50, % 70, % 90, % 100) kademeli olarak dehidre edilmiştir. Sonrasında tüm örnekler sıvının içerisinde kalacak şekilde heksametildisilazan içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Doku iskelelerinin üzerinden heksametildisilazan tamamen uzaklaştırılarak 1 gece kurumaya bırakılmıştır. Doku iskeleleri altın-palladyum (Au-Pd) ile kaplanarak SEM analizi (Quanta 400F, USA) gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında süperkritik CO₂ (skCO₂) ve partikül uzaklaştırma yöntemi birarada kullanılarak biyobozunur polimer temelli ve grafen oksit katkılı nanokompozit doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bunun için polimer /tuz /çözücü üçlü bileşiminden skCO₂ destekli faz ayrımı ile çözücü ayrılmış, ardından porojen görevi gören tuzun yapıdan uzaklaştırılması ile üç boyutlu ve gözenekli doku iskeleleri elde edilmiştir. Doku iskelelerinin morfolojik ve kimyasal yapıları ile termal özellikleri uygun teknikler ile analiz edilmiştir. Elde edilen doku iskelelerinde hücre davranışının incelenmesi amacıyla L-929 fare fibroblast hücreleri ile hücre kültürü çalışmaları yürütülmüştür. Bu bölümde yapılan deneysel çalışmalarla ilgili sonuçlar verilmiş ve literatürde yer alan bilgilerle karşılaştırılmıştır.

4.1 Süperkritik Akışkan Ortamında Faz Ayrımı ve Partikül Uzaklaştırma ile Polimerik Doku İskelelerinin Üretimi

Tez çalışması kapsamında poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polikaprolakton (PCL) polimerleri kullanılarak süperkritik CO₂ ortamında üç boyutlu gözenekli doku iskelelerinin üretimi hedeflenmiştir. Doku iskelelerinde homojen gözenek boyutu ve dağılımın sağlanabilmesi için skCO₂ faz ayrımı yöntemi ve partikül uzaklaştırma yöntemi birarada uygulanmıştır.

Süperkritik CO₂ (skCO₂) ile faz ayrımı yönteminin temelinde çözücü-anti çözücü etkileşimi sonucu gerçekleşen faz ayrımı bulunmaktadır. Burada anti çözücü polimeri çözmeyen fakat polimerlerin çözücüsü olan birçok organik çözücüye afinitesi olan skCO₂'tir. Faz ayrımından sonra oluşan polimerce zengin fazın katılıp, çözücünün uzaklaştırılmasıyla gözenekli doku iskeleleri oluşmaktadır (Reverchon ve Cardea 2012). SkCO₂ uygulaması konvansiyonel yöntemlere göre daha kısa proses sürelerinde gerçekleşmekte ve çözücülerin yapıdan tamamen uzaklaşması sağlanmaktadır (Yıldırım vd. 2018). Tez çalışması kapsamında öncelikle biyobozunur ve biyoyumlu yapısı ile doku mühendisliği uygulamalarında ön plana çıkmış olan **PLGA (85:15)** polimeri ile deneysel çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalarda çözücü olarak diklorometan (DCM)

kullanılmış ve mikrogözenekliliğin artırılması amacıyla porojen olarak NaCl partiküller polimer çözeltisine ilave edilmiştir. DCM ile anti çözücü olarak görev alan K_2CO_3 arasında gerçekleşen faz ayrımı sonunda çözücünün uzaklaştırılmasıyla doku iskeleleri elde edilmiştir. Ancak, üç boyutlu makroskopik yapının korunmadığı görülmüş, yapıdaki kırılmalar ve kopmalar nedeniyle doku iskelelerini teflon kalıplardan çıkarmak mümkün olmamıştır.

Literatürde süperkritik karbondioksit prosesi ile gaz köpükleştirme yöntemi kullanılarak gözenekli yapıda PLGA doku iskelelerinin elde edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Tai vd. 2007, Yang vd. 2010, Mav vd. 2011). Bu proseslerde amorf PLGA zincirleri arasına rahatlıkla difüzleneren CO_2 plastikleştirici etkisi yapmaktadır. CO_2 difüzyonu polimerin reolojik özelliklerini değiştirmekte, zincirler arasına difüzleneren gaz baloncuklarının aniden ortamdan uzaklaştırılması ile gözenekli yapıların elde edilmesi mümkün olmaktadır. Ne var ki, elde edilen gözenek boyutunu ve yapısını kontrol etmek oldukça zordur (Tai vd. 2007).

Sıcaklık, basınç gibi sistem parametrelerinin yanı sıra LA/GA oranı da gözenekliliği ve gözenek boyutunu etkileyen önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Tai vd. (2007) tarafından yapılan çalışmalarda, basınç ve difüzyon süreleri arttırıldığında nükleasyon yoğunluğunun arttığı buna bağlı olarak daha küçük gözenekler elde edildiği sonucuna varılmıştır. Sıcaklık yükseldiğinde ise CO_2 difüzyon hızının artmasına bağlı olarak daha büyük gözeneklere sahip yapılar elde edilmiştir. Glikolik asit miktarının artmasıyla gözenek çapında azalma olduğu bulunmuştur.

Tez çalışması kapsamında süperkritik CO_2 sistem parametrelerinin ve LA/GA oranının PLGA doku iskeleleri üzerindeki etkilerini azaltmak amacıyla, gaz köpükleştirme yöntemi yerine faz ayrımı yönteminin uygulanması öngörülmüştür. Ne var ki, elde edilen doku iskelelerinin kırılma yapıları manipülasyonlarını güçleştirmiş ve çalışmalara devam edilememiştir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan diğer polimer **polikaprolakton (PCL)** dur. PCL, hidrofobik ve yarı kristalin bir polimerdir. Kristalinitesi molekül ağırlığının artmasıyla

birlikte azalma eğilimi gösterir. PCL'nin çözünürlüğü ve düşük erime noktası (59-64 °C) biyomedikal alanda geniş kullanım alanına sahip olmasını sağlamıştır (Woodruff vd. 2010). PCL; doku gelişimi için yeterli mekanik destek sağlayabilmekte ve doku onarıldıktan sonra hiçbir toksik özellik göstermeden bozunabilmektedir. Kemik, kıkırdak, deri, kalp ve sinir doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Mondal vd. 2016). Literatürde PCL ile ilgili yapılan çalışmalarda biyoaktivitesinin artırılması amacıyla biyolojik stimülasyonu sağlayan biyoaktif moleküllerin PCL yapısına eklendiği görülmektedir (Gürbüz vd. 2016). PCL ile elektroçirime yöntemi kullanılarak fiber şeklinde, diğer klasik doku iskelesi üretim yöntemleri (çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma, gaz köpükleştirme, faz ayırma) kullanılarak 3-B yapıda doku iskeleleri elde edilmektedir (Mondal vd. 2016).

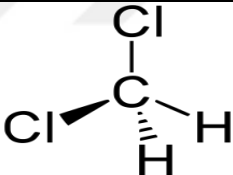
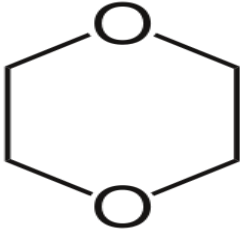
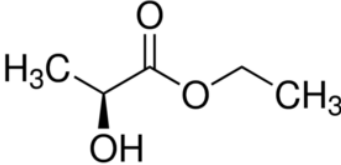
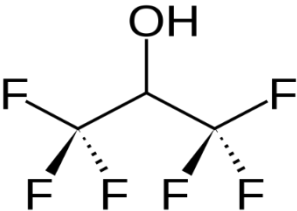
Sultana ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere polikaprolakton polimeri ve 1-4 dioksan çözücüsü ile termal yolla gerçekleşen faz ayrımı yönteminden yararlanılarak doku iskeleleri elde edilmiştir (Sultana ve Khan 2013). Madde alışverişini sağlayacak yeterlilikte gözeneklilik (>% 70) ve mikron boyutunda gözenek boyutu ile yapının mekanik özelliklerini belirleyen sıkıştırma modülü malzeme ve işlem parametreleri optimize edilerek ayarlanmıştır.

Salerno ve grubu tarafından yürütülen bir diğer çalışmada ise, kemik rejenerasyonunu sağlamak amacıyla $skCO_2$ ile gaz köpükleştirme yöntemiyle PCL doku iskeleleri elde edilmiştir (Salerno vd. 2010). Doku iskelelerinin gözenekliliğinin kontrolü $skCO_2$ 'in sıcaklığı ve basıncı ayarlanarak yapıya difüzyonu sırasında gerçekleşen süperdoyguluk durumundaki çekirdeklenmeyle sağlanmıştır. Sıcaklık ve basınç değerlerinin optimize edilmesiyle doku iskelelerinin mikro yapısı da önemli ölçüde etkilenmiştir.

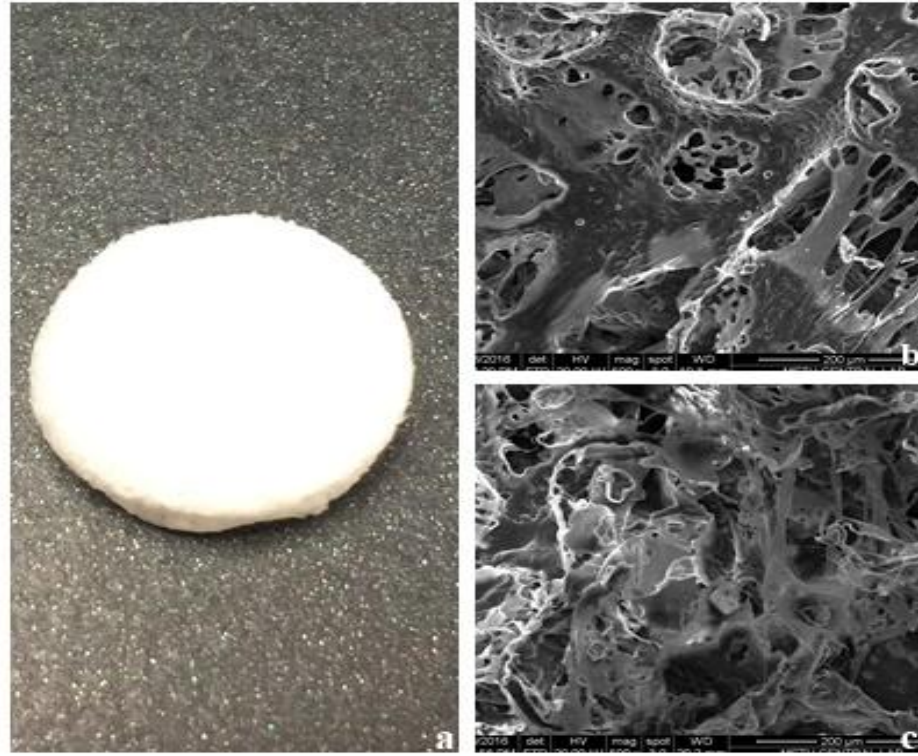
Tez çalışması kapsamında PCL doku iskeleleri $skCO_2$ destekli faz ayırma ve partikül uzaklaştırma yöntemlerinin birarada kullanılmasıyla elde edilmiştir. Kullanılan çözücüler 1-4 dioksan, 1,1,1,3,3,3 hekzafloroizopropanol (HFIP), diklorometan (DCM) ve etil laktat (EL)'dir (Çizelge 4.1). Çözücüler seçilirken PCL'nin Hildebrand çözünlük parametresinin çözücülerin Hildebrand parametresine yakın olmasına

dikkat edilmiştir. Literatürden bu parametreler PCL: 19.7 (MPa)^{1/2}, DCM: 19.8 (MPa)^{1/2}, EL: 21.3 (MPa)^{1/2}, 1-4 dioksan: 19.0 (MPa)^{1/2} ve HFIP: 19.3 (MPa)^{1/2} olarak bulunmuştur (Barton, 2017). Öncelikle PCL'nin belirlenen çözücülerde % 15(w/w)'lik derişimde çözeltileri hazırlanmıştır. Ardından mikrogözeneklerin oluşumunu sağlamak için sodyum klorür (NaCl) partikülleri eklenmiştir. Polimer/NaCl/çözücü homojen bir karışım oluşturduğunda Bölüm 3.2.1.1'deki işlemlerden sonra doku iskeleleri elde edilmiştir. Elde edilen doku iskeleleri için çizelge 3.2'de belirtilen parametreler uygulanıp doku iskelelerinin 3-B yapı ile morfolojik ve kimyasal yapıları karşılaştırılmıştır. SkCO₂ difüzyon ve çözücü uzaklaştırma süresinin 150 dk, skCO₂ akış hızının 5g/dk, uygulanan sıcaklığın 35 °C ve uygulanan basıncın 165 bar olarak belirlenmesi ile hücre üremesi, besin girişi ve atık maddelerin çıkışına olanak sağlayan morfolojik (gözeneklilik, gözenek boyutu) özelliklere sahip, doku mühendisliğine uygun yapıların elde edildiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.1 Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan çözücülerin özellikleri

Çözücü	Kimyasal Formül	Özellik	Kaynama Noktaları (K)
Diklorometan		Apolar aprotik	312.8
1-4 Dioksan		Polar protik	374.5
Etil Laktat		Polar protik	427.0
HFIP		Polar protik	332.0

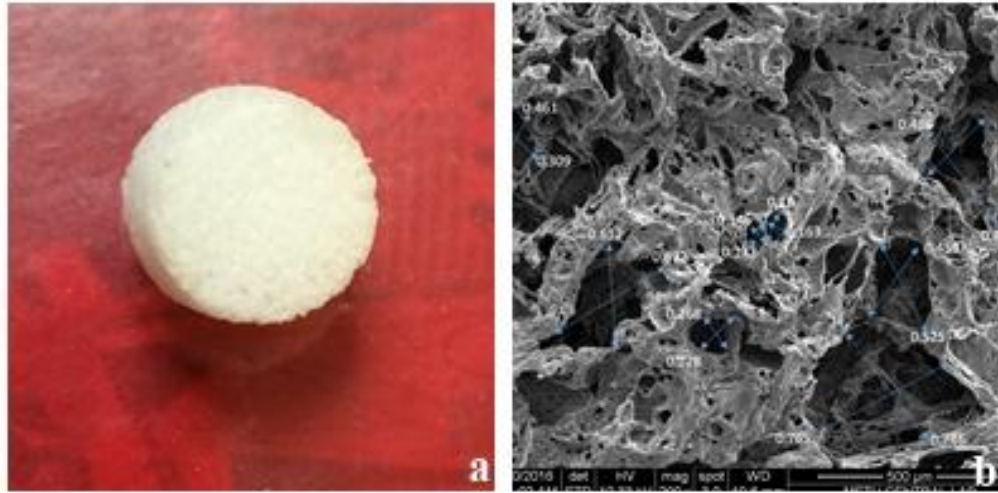
Tez çalışması sırasında çözücü olarak 1-4 dioksan kullanıldığında (Şekil 4.1) çözücü belirlenen ılımlı $skCO_2$ koşullarda uzaklaştırılmış ancak SEM görüntülerinde doku mühendisliği uygulamaları için istenilen gözenek yapısına sahip olmadığı görülmüştür (Şekil 4.1c).



Şekil 4.1 1-4 dioksanla çözücüsüyle elde edilen PCL doku iskelelerinin makroskopik görüntüsü ve SEM görüntüleri

a. 3-B yapı, b. Yüzey, c. Kesit

Tez çalışması kapsamında diklorometan çözücü olarak kullanıldığında ve belirlenen (Şekil 4.2) süperkritik işlem parametreleri uygulandığında çözücünün uzaklaştığı ve SEM görüntülerinden istenilen gözenek yapısına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Yapının kesit görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.2.b) gözenekli yapının oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.2 DCM çözücüsüyle elde edilen PCL doku iskelesinin makroskopik görüntü ve SEM kesit görüntüsü

a. 3-B yapı, b. 500µm'de 200× büyütmede SEM görüntüsü

Literatürde, 1-4 dioksan ve DCM çözücüleri kullanılarak poli-L-laktik asit doku iskeleleri süperkritik CO₂ destekli faz ayrımı yöntemiyle elde edilmiştir (Deng vd 2013). Yapılan çalışmalarda farklı çözücülerle hazırlanan doku iskelelerinin kesit görüntüleri incelendiğinde elde edilen yapıların güçlü bir şekilde kullanılan çözücünün türüne bağlı olduğu görülmüştür. Sadece DCM çözücüsüyle hazırlanan örneklerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinde gözenek boyutu 10µm-50µm arasında olan mikrogözenek yapısı dikkat çekerken, 1-4 dioksan çözücüsüyle hazırlanan örneklerde DCM ile hazırlanan örneklerde görülmeyen homojen nanofibröz ağ yapısı dikkat çekmektedir. 1-4 dioksan/DCM çözücü sistemiyle elde edilen doku iskelelerinin de homojen mikro yapıda gözenekli ve iç gözenek yapısı pürüzlü yapılar elde edilmiştir (Deng vd. 2013).

Tez çalışması kapsamında uygulanan yöntemde gözenekli doku iskelelerinin oluşma mekanizması iki basamakta gerçekleşmektedir. Polimer / tuz / çözücü bileşimi skCO₂ ortama alındığında, polimerin organik çözücüsü skCO₂ tarafından ekstrakte edilmekte ve polimer için bir konsantrasyon gradyeni meydana gelmektedir. Sonrasında skCO₂ örnek içerisine difüzlenerak faz ayrımını tetiklemekte ve polimerce zengin bir fazın oluşmasını sağlamaktadır. skCO₂'in doku iskelesinden uzaklaşmasıyla organik çözücü ekstrakte edilmektedir. skCO₂'in sürekli olarak sistemden geçirilmesi ile tamamen kuru

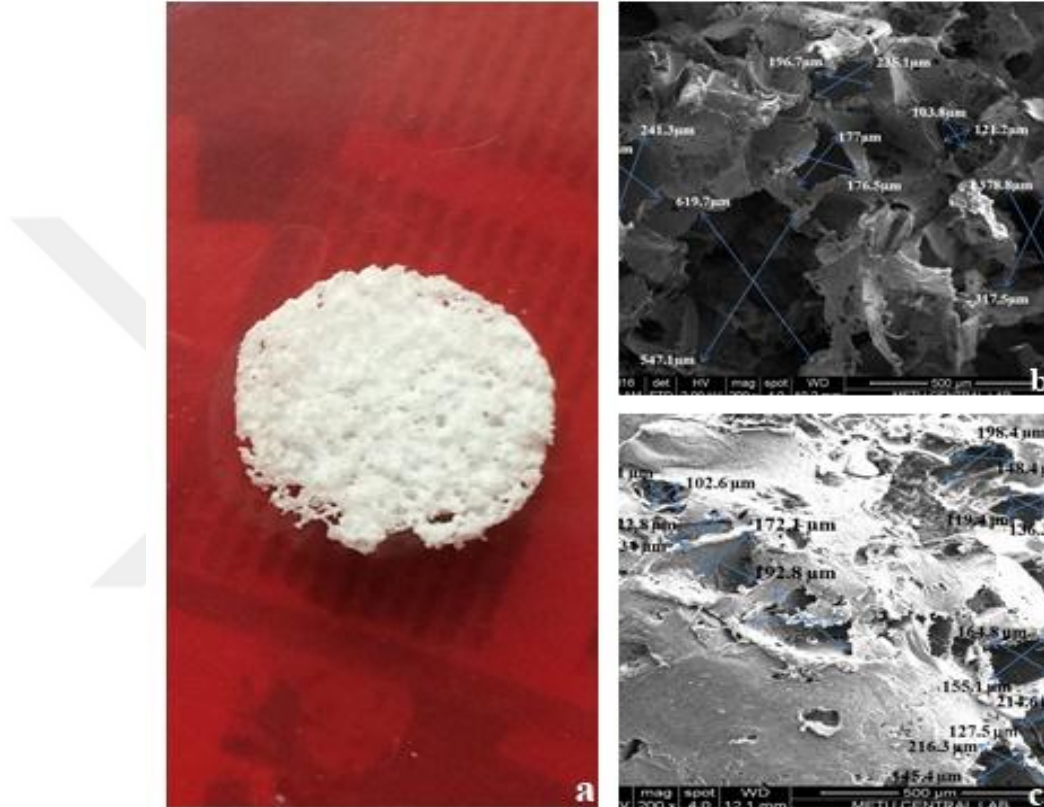
doku iskeleleri elde edilir. Bu proses üçlü bir karışımdaki (çözücü, anti-çözücü, polimer) etkileşimleri içermekte ve oluşan yapının morfolojik özellikleri sıvı-sıvı faz ve sıvı-katı faz arasındaki etkileşimlere bağlı olarak değişim göstermektedir. Bununla birlikte üç boyutlu yapı içerisinde oluşan gözeneklilik bir porojen eklenmesiyle etkilenmektedir. Porojen eklenmesi, polimerce fakir fazda heterojen çekirdeklenmeler ve sonuçta küçük boyutta gözeneklerin yapıya eklenmesine neden olabilir. Aynı zamanda porojenin bulunması çözelti viskozitesini arttıracığından faz ayrımı süresi uzamakta bunun sonucunda daha büyük gözenekler elde edilebilmektedir.

Tez çalışması kapsamında çözücü olarak kullanılan diklorometanın skCO₂ içerisindeki çözünürlüğü 1-4 dioksana göre daha yüksektir (Deng vd. 2013, Girard vd 2016.). Kullanılan çözücünün skCO₂'e afinitesinin yüksek olması ılımlı süperkritik koşullarda faz ayrımını ve gözenekli polimer yapıların oluşmasını desteklemiştir.

Tez çalışmasında HFIP çözücü olarak kullanıldığı durumda süperkritik işlem sonrası doku iskelesinden çözücünün uzaklaşmadığı görülmüştür. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, HFIP kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, HFIP'nin yüksek buhar basıncı (158 mmHg) bir dezavantaj olarak değerlendirilmiştir (Duarte vd 2011). Duarte vd tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada kitosan, HFIP içerisinde çözülerek skCO₂ koşullarda faz ayrımı ile doku iskelesi üretimi hedeflenmiştir. Araştırmacılar tarafından elde edilen sonuçlar HFIP'nin hızla yapıdan buharlaşması sonucu, skCO₂'in yapıya difüzyonu gerçekleşmeden, çözücünün yapıdan uzaklaşması ve kalın bir gözeneksiz tabakanın oluşumudur. Tez çalışmasında gerçekleştirilen deneylerde ise belirlenen skCO₂ koşullarında HFIP'nin uzaklaştırılmadığı görülmüş, tamamen kuru doku iskelesi elde edilememiştir. Bu durumun polimer /tuz /çözücü üçlü karışımındaki etkileşimler ve NaCl'nin porojen olarak yapıya eklenmesiyle HFIP'nin yapıdan uzaklaştırılmaması sonucunda olduğu düşünülmüştür.

Çalışma kapsamında kullanılan ve laktat ester sınıfından olan EL, düşük toksisiteye sahip olması, teratojenik olmaması ve potansiyel sağlık riski taşımaması nedeniyle alternatif çözücü olarak biyomedikal alanda ön plana çıkmaktadır. Ayrıca skCO₂'e olan

yüksek afinitesi onu daha cazip hale getirmektedir. Bununla birlikte DCM gibi geleneksel organik çözücülerin aksine biyobozunur yapıdadır. Tez çalışması kapsamında EL kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin kesit görüntülerinden (Şekil 4.3.b) gözenekli yapının olduğu açıkça görülmektedir. Ortalama gözenek çapı: $219.2 \pm 89.66 \mu\text{m}$ 'dir (Şekil 4.3.b).

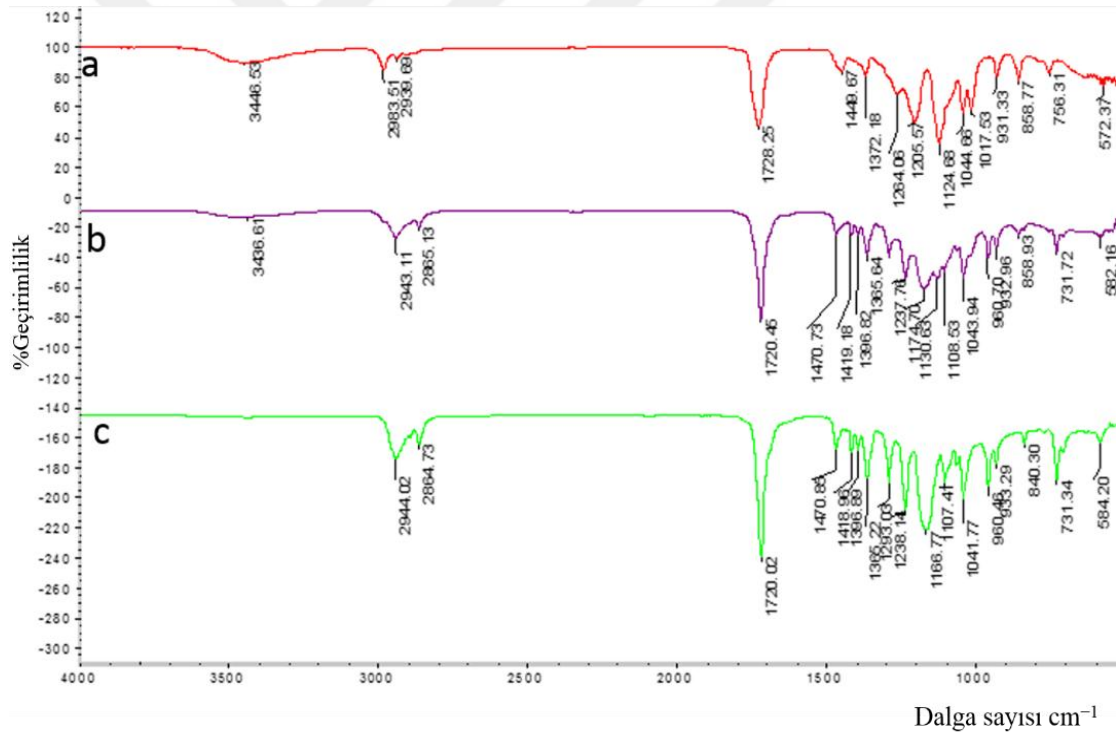


Şekil 4.3 EL çözücüsüyle hazırlanan PCL doku iskelelerinin makroskopik görüntüsü ve SEM görüntüleri

a. 3-B yapı, b. kesit, c. yüzey

EL çözücüsünün yeşil çözücü ve biyobozunur olması gibi özelliklerinin yanı sıra ucuz ve kolay elde edilebilir olması da avantajları arasında sayılmaktadır (Paul vd. 2016). Bununla birlikte yüksek kaynama noktası ($154 \text{ }^\circ\text{C}$) ve buhar basıncı (2 mmHg ($20 \text{ }^\circ\text{C}$)) nedeniyle, oda koşullarında polimerik yapılardan uzaklaştırılması mümkün değildir (Yıldırım vd. 2018). Bu dezavantajın ortadan kaldırılması amacıyla, tez çalışmasında EL'nin yapıdan uzaklaştırılması skCO_2 ortamında gerçekleştirilmiştir. Literatür araştırmalarında EL çözücüsü ile polilaktik asit (PLA) doku iskelelerinin

hazırlanmasında nanofibröz yapı elde etmek için termal faz ayrımı ve skCO₂ kurutma tekniğini bir arada kullanılmıştır (Salerno vd. 2015). SEM görüntüleri incelendiğinde birbiriyle içsel bağlantılı nanofibröz yapıda doku iskeleleri elde edildiği görülmüştür. Tez çalışması kapsamında skCO₂ ile hazırlanan doku iskelesi ile oda koşullarında çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemiyle hazırlanan doku iskelesinin FTIR-ATR spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4). Şekil 4.4 incelendiğinde EL çözücüsü ile 4 gün boyunca oda sıcaklığında çözücünün uzaklaştırılması ile elde edilen doku iskelesinin spektrumunda EL'nin karakteristik piki olan 3600-3200 cm⁻¹ 'deki O-H gerilmesi piki görülmektedir. Bu pikin skCO₂ ile hazırlanan doku iskelesinin yapısında bulunmaması skCO₂ yöntemiyle çözücünün tamamen uzaklaştırıldığını desteklemektedir.



Şekil 4.4.a. Etil laktat çözücüsü, b. çözücü döküm ile hazırlanmış doku iskelesi, c. süperkritik işlemle elde edilmiş doku iskelesinin FTIR-ATR spektroskopisi

Salerno vd. (2014) yılında yaptıkları çalışmada, PCL ve PLA polimerleriyle katı-hal köpüklenme yöntemi kullanılarak doku iskeleleri elde etmişlerdir. Çalışmada etil laktat diğer organik toksik çözücülere alternatif olarak kullanılmıştır. Etil laktat, potansiyel

sağlık riski taşımadığı onaylandığından biyobozunur polyesterler için plastikleştirici olarak seçilmiştir. skCO₂-etil laktat ikili karışımı sadece skCO₂ kullanılan durumla karşılaştırıldığında daha büyük gözeneklerin ve daha düşük gözenek yoğunluğunun olduğu görülmüştür. Etil laktatın skCO₂'e karışımının PCL köpüklenmesi için gerekli mikro/nano yapıyı sağladığını gözlemlemişlerdir.

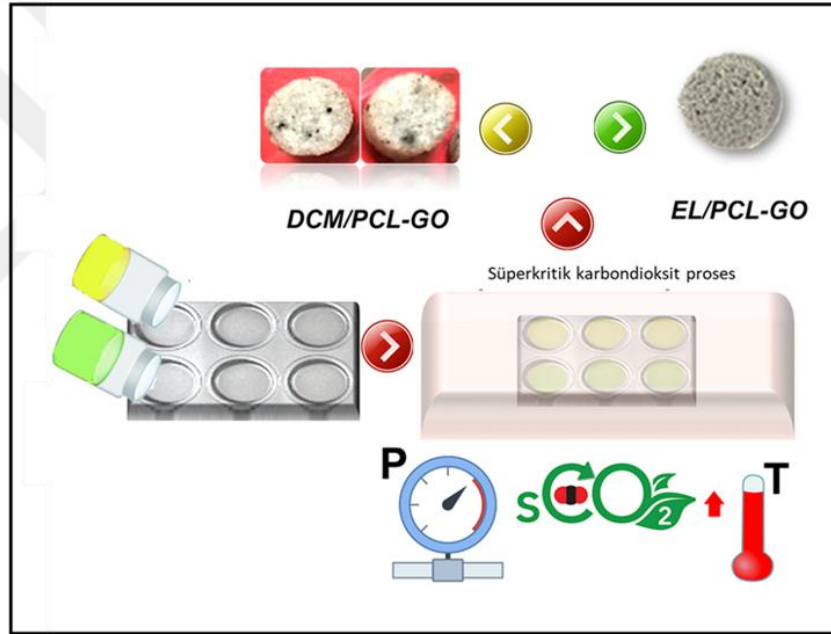
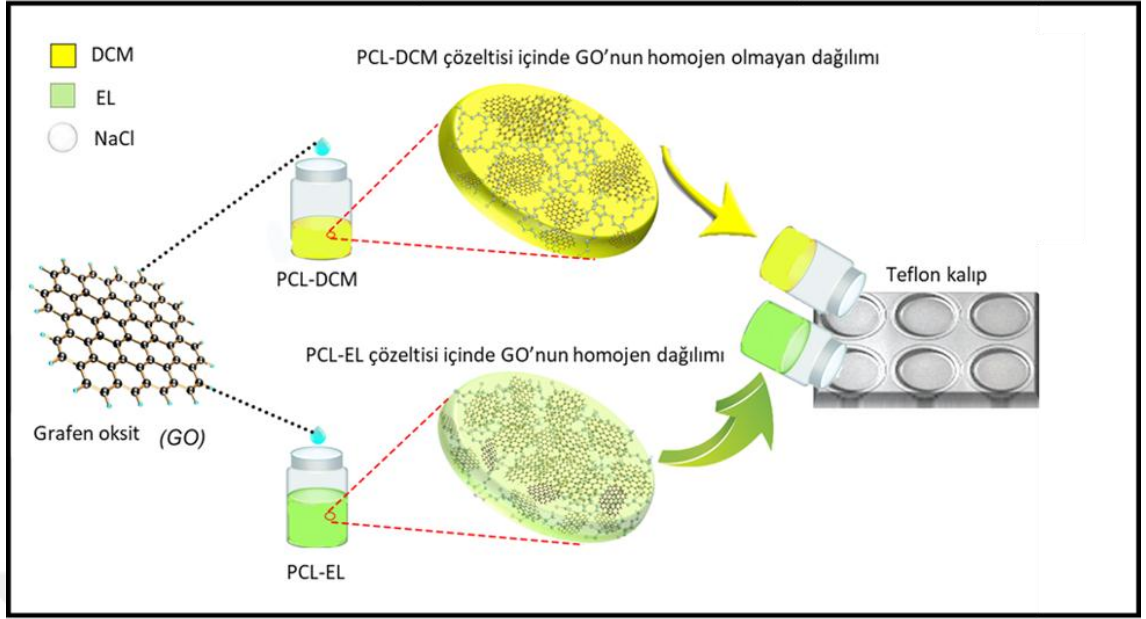
Salerno vd. (2014) yılında yaptıkları bir diğer çalışmada ise, doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanılmak üzere mikro gözenekli fibröz PLA aerojelleri termal yolla gerçekleşen faz ayrımı yöntemiyle hazırlanmıştır. Çalışmasa skCO₂-etil laktat ikili karışımı kullanılmıştır. Kontrollü morfoloji ve gözenek yapısının sağlandığını gözlemlemişlerdir.

Tez çalışmasında kullanılan tüm çözücüler karşılaştırıldığında gözenek boyutu ve gözeneklilik açısından EL ve DCM çözücülerini ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2 Grafen Oksit Katkılı PCL Doku İskelelerinin skCO₂ Ortamda Faz Ayrımı ve Partikül Uzaklaştırma Yöntemi ile Elde Edilmesi

Grafen oksit (GO); yüksek yüzey alanı ve hidrofilik yapıdaki fonksiyonel grupları nedeniyle son yıllarda biyotıp alanında yapılan araştırmalarda ilgi çekmektedir. Kuvvetli adsorpsiyon kapasitesi, hücre üremesi ve farklılaşmasında etkin olan moleküllerin grafen oksit yüzeyinde zenginleşmesini sağlamaktadır (Noh vd. 2017). Bu özelliklerinden dolayı grafen oksit katkılı yapıların hücre yapışması, üremesi ve farklılaşmasında etkin rol oynayacağı düşünülmüştür.

GO katkılı yapılar elde edilirken öncelikle GO'nun sonikasyonla tabakalarına ayrılması sağlanmıştır. GO; DCM ve EL'de dağıtılarak sonikasyon işlemiyle tabakalarına ayrılması sağlanıp polimer çözeltisine karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından Bölüm 3.2.1.1'deki işlemler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5'de EL ve DCM çözücüleriniyle hazırlanan PCL-GO nanokompozit doku iskelelerinin şematik gösterimi verilmiştir.



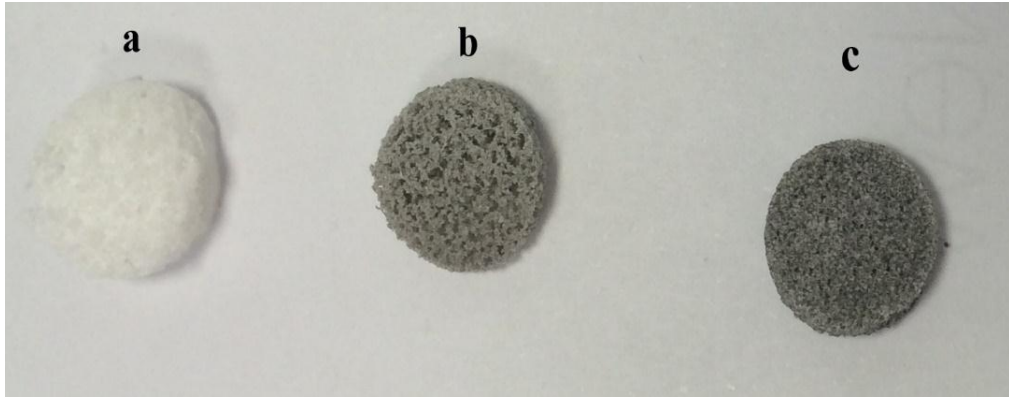
Şekil 4.5 EL ve DCM çözücüleriyle hazırlanan PCL-GO nanokompozit doku iskelelerinin elde edilmesi

GO'nun tabakalarına ayrılması amacıyla gerçekleştirilen sonikasyon işleminde GO'nun DCM çözücüsünde homojen olarak dağılmadığı, tabakaların koagüle olarak çözelti karışımında kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.6). DCM, PCL için iyi bir çözücü olmasına karşın, hidrofobik özellikte olması, yapısındaki OH grupları nedeniyle hidrofilik karaktere sahip olan GO tabakalarının koagüle olmasına neden olmuştur.



Şekil 4.6 DCM çözücüsü içinde sonikasyon işlemi gerçekleştirilen PCL-GO kompozit doku iskelelerinin makroskopik görüntüsü

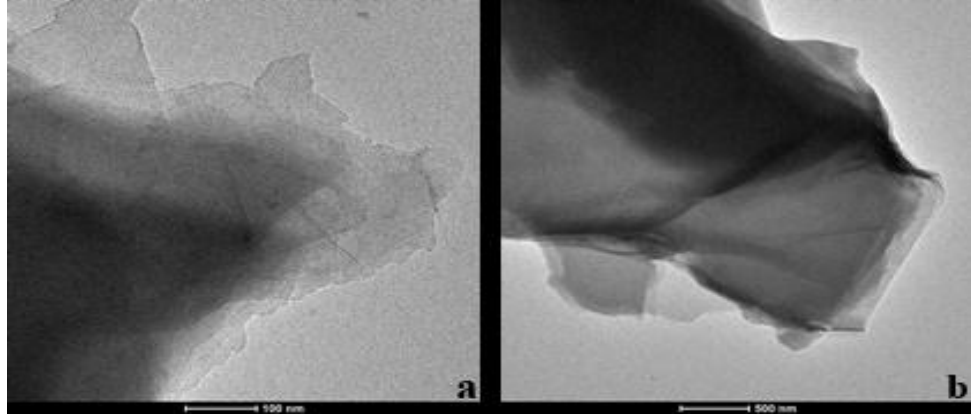
Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda PCL/GO nanokompozit yapıların hazırlanmasında EL çözücüsü ile devam edilmesine karar verilmiştir. Etil laktatın polar protik özelliği hidrofilik GO nanotabakalarının polimer çözeltisi içerisinde kolaylıkla dağılmasını sağlamıştır. EL'in çözücü olarak kullanıldığı durumda hazırlanan PCL-GO nanokompozit doku iskelelerinde GO tabakalarının homojen olarak yapı içerisinde dağıldığı görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 SK-CO₂ ortamda faz ayrımı / partikül uzaklaştırma sonrasında, EL çözücüsüyle hazırlanan PCL ve PCL-GO doku iskelelerinin makroskopik görüntüleri

a. PCL-EL, b. PCL-EL-% 1GO, c. PCL-EL-% 3GO

Grafen oksidin EL çözücüsü içerisinde dağıtılması ile elde edilen tabakalara ait geçirimli elektron mikroskobu TEM görüntüleri şekil 4.8'de sunulmuştur.



Şekil 4.8 Grafen oksidin: a. 100nm, b. 500 nm’de alınan TEM görüntüleri

TEM görüntüleri incelendiğinde birkaç katman halinde grafen oksidin tabakaları dikkat çekmektedir. Bunun sonucunda grafen oksidin ultrasonik banyoda EL ile sonikasyon sonrasında tabakalarına ayrılması işleminin verimli bir şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir.

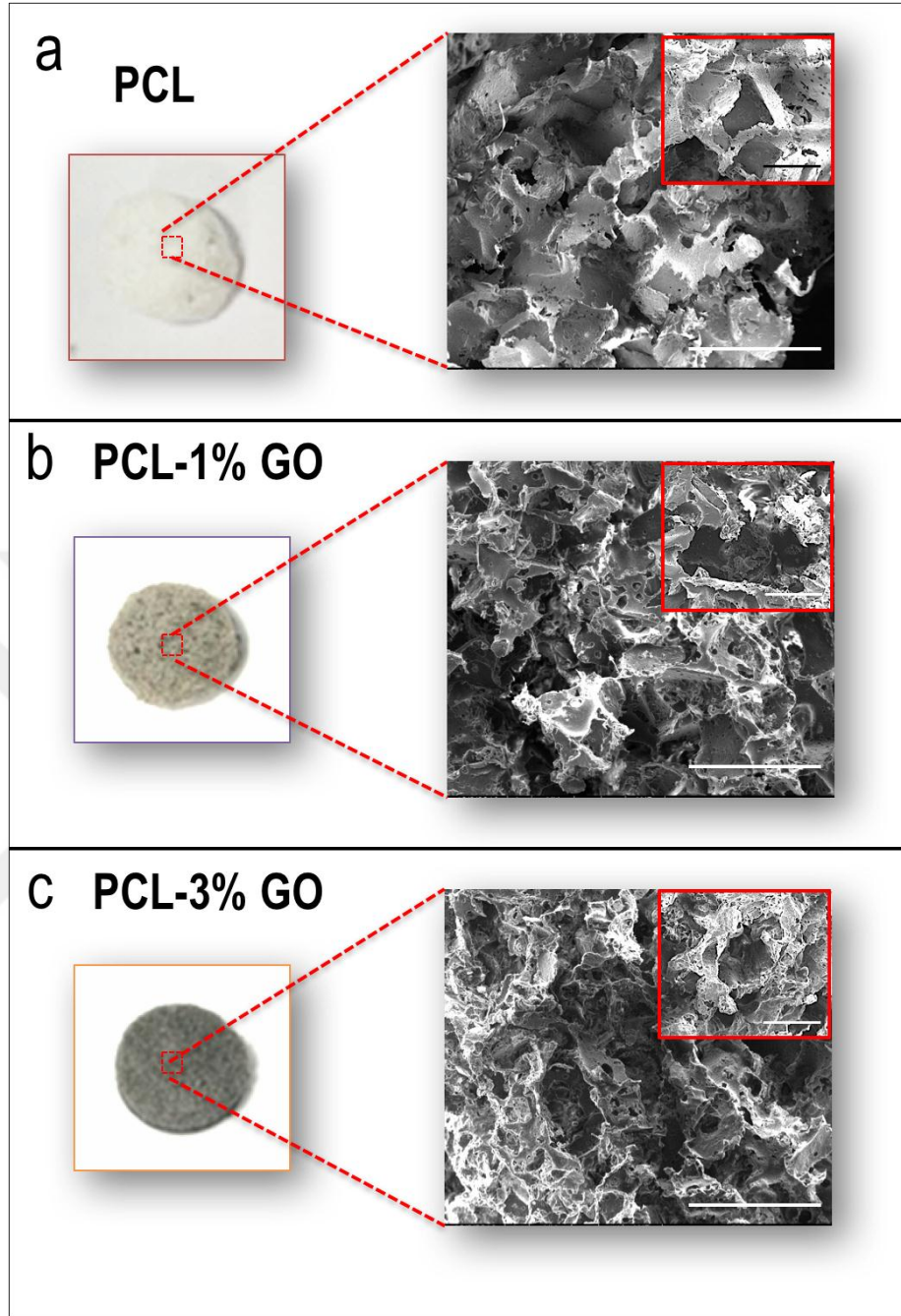
4.3 PCL ve Grafen Oksit Katkılı PCL Nanokompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

skCO₂ destekli faz ayrımı ve partikül uzaklaştırma yöntemlerinin birarada kullanılması ile PCL /EL /NaCl ve PCL -GO / EL /NaCl bileşimlerinden hazırlanan üç boyutlu doku iskelelerinin karakterizasyonu amacıyla SEM, FTIR-ATR, XRD ve Raman spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu bölümde analizlerden elde edilen bulgular açıklanmıştır.

4.3.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik yapının belirlenmesi

Morfolojik yapının ve gözenek boyutlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen SEM analizlerinden elde edilen sonuçlar şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9 EL çözücüsüyle ile hazırlanan PCL, PCL-% 1GO ve PCL-% 3GO nanokompozit doku iskelesinin SEM görüntüleri

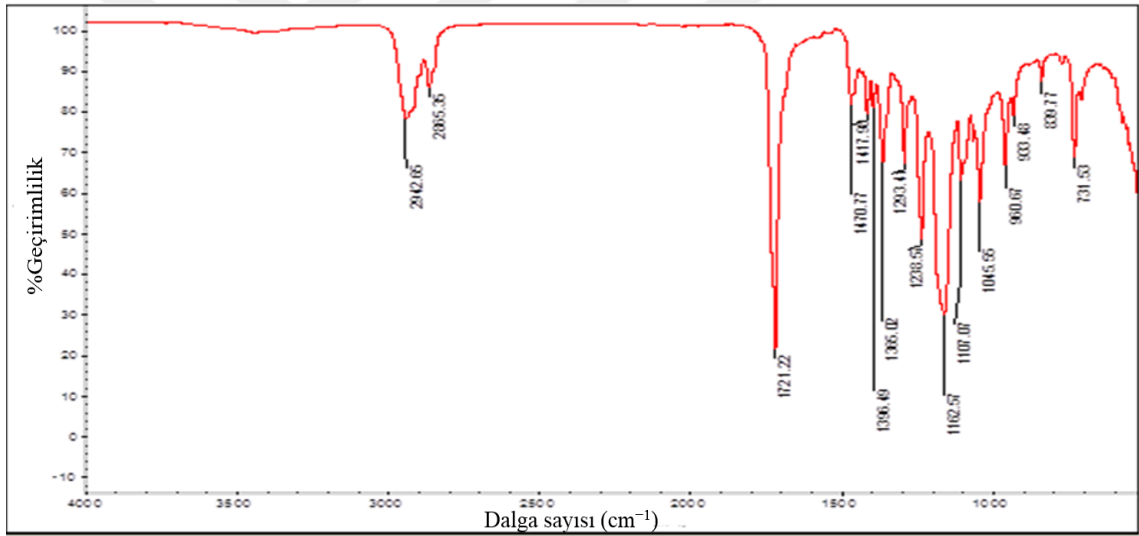
a. PCL, b. PCL-% 1GO, c. PCL-% 3GO

SEM görüntüleri incelendiğinde, PCL-% 1GO doku iskelelerinde gözenekli yapının oluştuğu, yüzeyde karşılaşılan gözeneksiz tabakanın PCL doku iskelelerine göre daha az olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.9.b). Ortalama gözenek çapı $280.15 \pm 34.4 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır.

Grafen oksit miktarının artırılarak % 3 oranına çıkarıldığı durumda, PCL ve PCL-% 1 GO doku iskelelerinin SEM görüntülerine benzer olarak gözenekli yapıların oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.9.c). Ortalama gözenek çapı $267.85 \pm 26.3 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır.

4.3.2 Fourier transform infrared-attenuated total reflectance (FTIR-ATR) spektroskopisi ile kimyasal yapının tayini

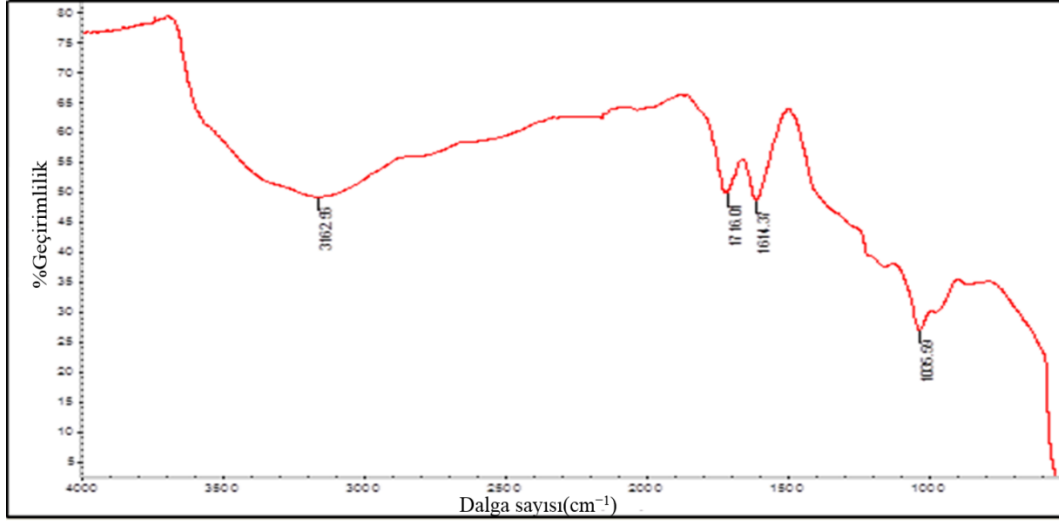
Tez kapsamında hazırlanmış olan PCL ve PCL-GO doku iskelelerinde bulunan grupların belirlenmesi amacıyla FTIR-ATR analizleri yapılmıştır. PCL doku iskelesine ait FTIR-ATR spektrumu şekil 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.10 PCL doku iskelesine ait FTIR-ATR spektrumu

Spektrum incelendiğinde PCL’ye ait karakteristik pikler görülmektedir. Bunlar sırasıyla; 2921 cm^{-1} ve 2867 cm^{-1} dalga sayısında alifatik C-H gerilmesi, 1721 cm^{-1} ’de C=O gerilmesi, 1162 cm^{-1} ve 1470 cm^{-1} ’de ise CH_2 gruplarına ait eğilme ve gerilme deformasyonlarıdır (Phillipson vd. 2014).

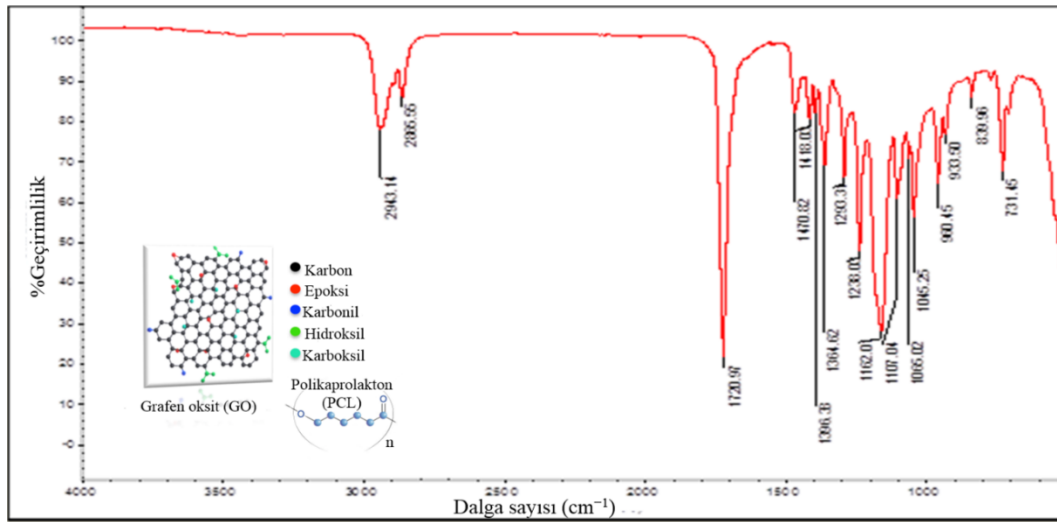
GO’nun yapısına ait spektrum şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11 GO'nun yapısına ait FTIR-ATR spektroskopisi

Grafen okside ait spektrum incelendiğinde, 3162 cm^{-1} dalga sayısındaki geniş bandın O-H gerilmesine ait olduğu görülmektedir. C=O gerilmesi ve C=C düzlem içi vibrasyonları sırasıyla 1716 cm^{-1} ve 1614 cm^{-1} 'de yer almaktadır (Chu vd. 2014).

Grafen oksitin PCL çözeltisine karıştırılmasıyla elde edilen PCL-GO doku iskelesine ait FTIR-ATR spektrumu şekil 4.12'de sunulmuştur.



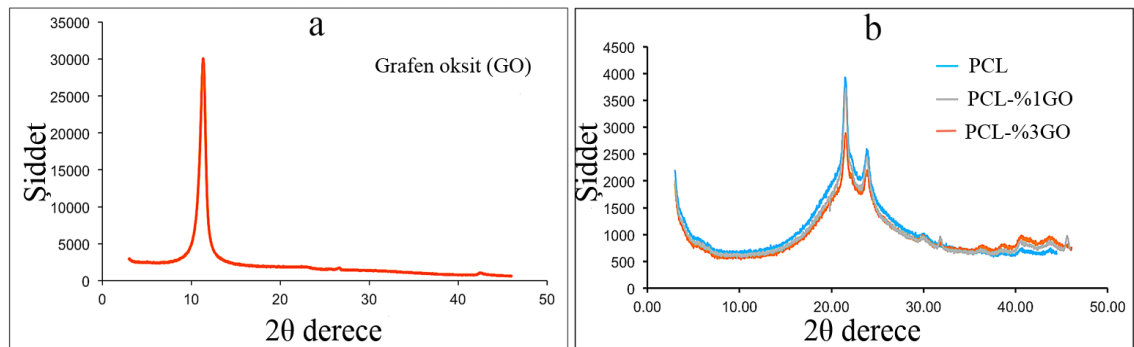
Şekil 4.12 PCL-% 3 GO yapıya ait FTIR-ATR spektrumu

Şekil 4.12 incelendiğinde, GO katkılı PCL doku iskelesinin kimyasal yapısında hiç bir değişim olmadığı, spektrumdaki tüm piklerin şekil 4.13'de verilmiş olan PCL

spektrumundan elde edilen pikler ile aynı dalga sayısında olduğu görülmektedir. FTIR spektrumlarından elde edilen bu sonuç, GO yapısının PCL içerisinde yalnızca fiziksel karışım yoluyla dağıldığını ve PCL ile GO arasında bir kimyasal etkileşim oluşmadığını göstermektedir (Shen vd. 2015). Literatürde Depan ve grubu tarafından yürütülen bir çalışmada grafen oksit kitosan yapısına karıştırılarak kompozit doku iskeleleri elde edilmiştir. Yapılan FTIR analizlerinde kitosanın amin grupları ile GO yapısında bulunan karboksil gruplarının kimyasal olarak etkileşerek bağ yaptıkları sonucuna varılmıştır (Depan vd. 2011). Tez çalışması kapsamında kullanılan PCL yapısında GO ile etkileşecek aktif fonksiyonel grup olmadığı için kimyasal bağ oluşmamakta bu nedenle FTIR-ATR spektrumlarında değişim gözlenmemektedir.

4.3.3 X-Işınlari Kırınımı (XRD) Analizi

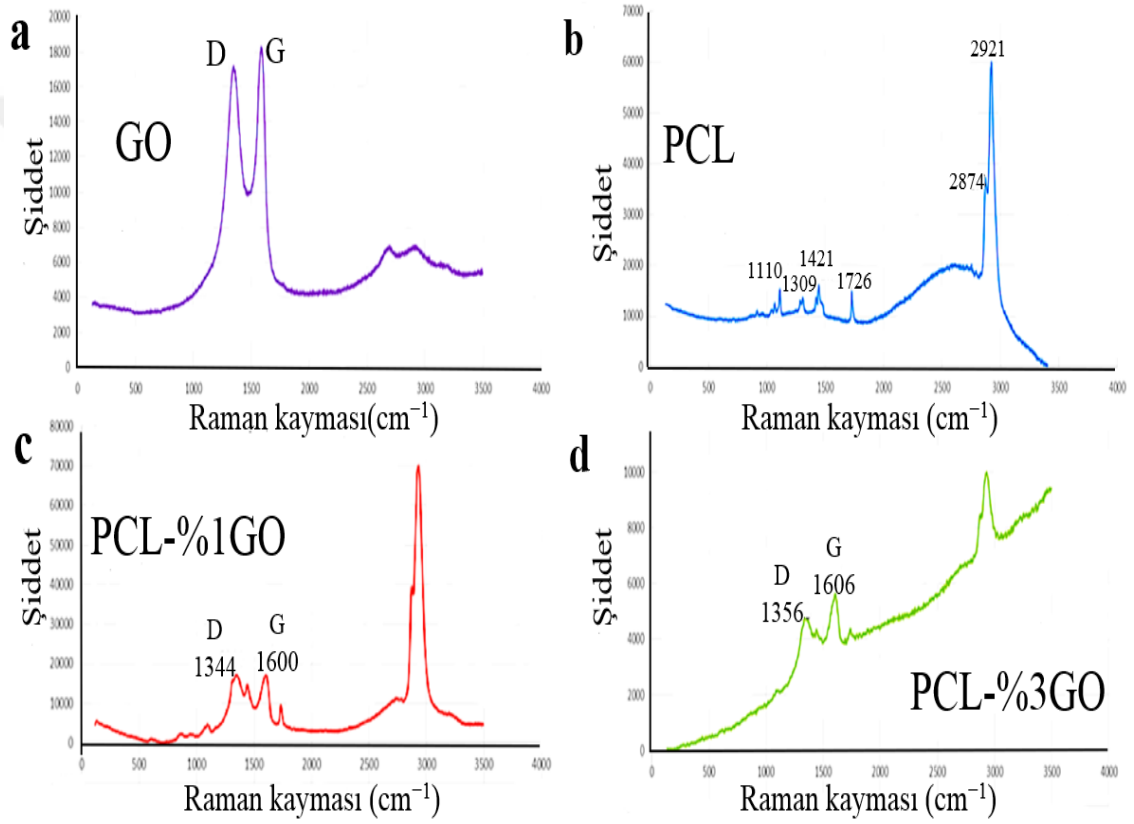
Polikaprolakton, grafen oksit ve polikaprolakton/grafen oksit doku iskelelerinin kristal yapılarını belirlemek amacıyla XRD analizi gerçekleştirilmiştir. PCL, GO ve PCL-GO nanokompozitinin XRD spektrumu şekil 4.14’de verilmiştir. GO kristal yapısındaki (001) düzlemine ait pik 11.3° ’de görülmektedir (Şekil 4.13.a). PCL’a ait spektrum incelendiğinde, PCL’nun ortorombik kristal yapısına ait (110) ve (200) düzlemindeki kırınım sırasıyla $2\theta=21.3^\circ$ ve 23.7° ’de gözlenmiştir. Grafen oksidin eklenmesi PCL’nin 21.3° pikinde azalmaya neden olmuştur. GO’nun PCL’ye eklenmesinin kristaliniteyi önemsiz ölçüde azalttığı sonucuna varılabilir (Yıldırım vd. 2018).



Şekil 4.13 a. GO, b. PCL, PCL-% 1GO ve PCL-% 3GO’nun XRD spektrumları

4.3.4 Raman Spektroskopisi Analizi

Grafen oksidin polikaprolaktonun yapısına katılıp katılmadığını belirlemek amacıyla Raman spektroskopisi analizi yapılmıştır. GO'nun Raman spektrumunda karakteristik pik olan 1347 cm^{-1} D bandını; 1586 cm^{-1} piki de G bandını temsil etmektedir. D bandı; A_{1g} simetrisindeki fotonların durumundan dolayı, G bandıysa sp^2 hibritleşmesine sahip C-C bağının E_{2g} fononunun gerilmesinden dolayı oluşmaktadır (Şekil 4.14).



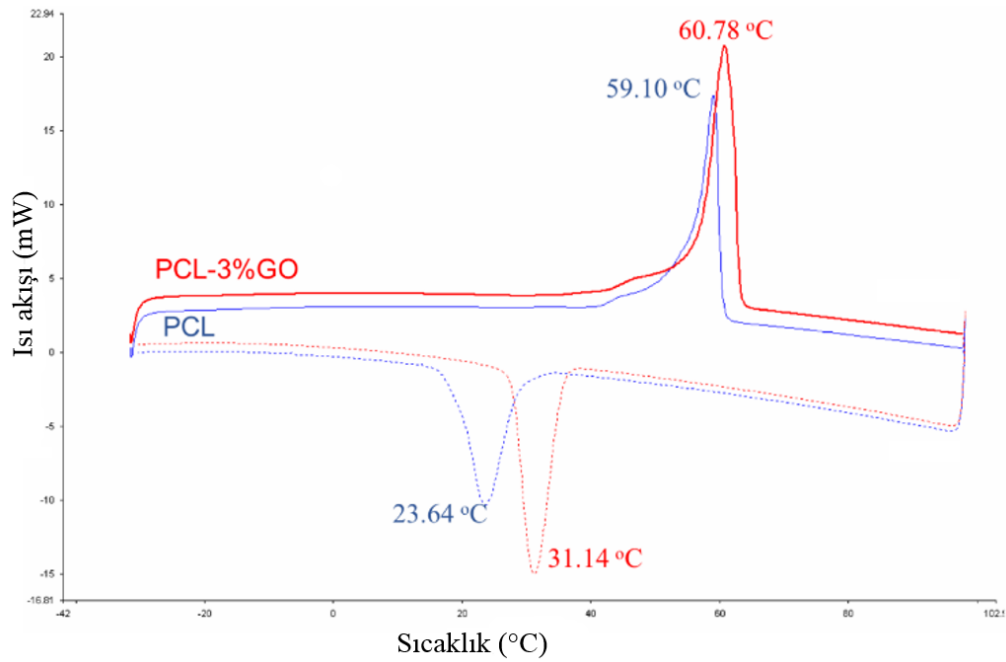
Şekil 4.14.a. GO, b.PCL, c. PCL-% 1GO, d. PCL-% 3GO'ya ait raman spektrumları

D bandının G bandına olan şiddet oranı I_D / I_G tipik GO yapısına uygun şekilde 0.94 olarak hesaplanmıştır (Liao vd. 2011). PCL 'nin spektrumunda ise karakteristik piklerden 2921 cm^{-1} C-H gerilme titreşimini; 1726 cm^{-1} piki de C=O gerilme titreşimini temsil etmektedir (Sayyar 2013). 1421 cm^{-1} 'de bulunan pik C-H eğilme titreşimlerine aittir. Sallanma titreşimleri ise, 1309 cm^{-1} ve 1110 cm^{-1} 'de bulunan pikler ile karakterize edilmektedir (Sayyar vd. 2013). PCL-GO spektumu incelendiğinde PCL'nin

karakteristik pikleriyle GO'nun D ve G bandı görülmektedir (Şekil 4.14). Buradan GO'nun PCL-GO nanokompozitinin yapısına katıldığı söylenebilir. PCL'nin karakteristik piki 2930 cm^{-1} şiddetinin GO derişiminin artmasıyla azaldığı görülmektedir.

4.3.5 Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi

PCL-GO nanokompozitinin termal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.15'de verilen DSC grafiği incelendiğinde; PCL yapısına GO'nun eklenmesinin kompozitin erime noktasında önemli bir değişim olmadığı görülmüştür (PCL: $59.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, PCL-% 3GO: $60.78\text{ }^{\circ}\text{C}$). Bununla birlikte, PCL için $23.64\text{ }^{\circ}\text{C}$ olan kristalizasyon sıcaklığı yapıya katılan grafen oksidin etkisiyle PCL-% 3GO nanokompozit yapısı için GO'in çekirdeklenme etkisine bağlı olarak $31.14\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye yükselmiştir (Sayyar vd. 2013).



Şekil 4.15 PCL ve PCL-% 3GO doku iskeleleri için DSC eğrileri

4.3.6 Hücre kültürü çalışmaları

PCL ve PCL/GO nanokompozit doku iskelelerinin biyoyumluluğu L-929 fare fibroblastları kullanılarak araştırılmıştır. Biyolojik cevaplar MTT analizi ile incelenmiştir (Shen vd. 2015). Absorbans değerindeki artış doğrudan kültür periyodu boyunca tüm doku iskelelerinde artan hücre sayısı ile ilgilidir.

GO'nun biyoyumluluğu üzerinde literatürde halen çelişkili sonuçlar bulunmakla birlikte, GO'in toksisitesinin derişim ve agregasyona bağı olarak değıştiğı bildirilmiştir (Kim vd. 2013). Literatürde GO'nun hücreler için toksik özelliğini araştıran çalışmada (Dinescu vd. 2014) kemik doku mühendisliğinde kitosan / GO kompozit doku iskeleleri üzerinde hücre kültürü çalışmaları yürütmüşlerdir. Kitosan ve kitosan/GO doku iskelelerine ekilen hücrelerin metabolik olarak aktif kaldıklarını ve kültürün 7 günü boyunca çoğaldıklarını gözlemlemişlerdir. Ayrıca kültürün 2. gününden sonra kitosan / % 0.5GO ve kitosan / % 3GO doku iskelelerindeki hücrelerin sadece kitosan doku iskelesine oranla daha yüksek hücre canlılığı ve çoğalma hızı gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. Bu durumdan GO'nun hücrelerde toksik özellik göstermesinin aksine hücrelerin metabolik aktivitesi ve çoğalmasını geliştirdiğı sonucuna varmışlardır. Liao ve grubu tarafından yürütölen bir araştırmada grafen ve grafen oksidin hemolitik aktivitesi ve fibroblastik hücrelerin canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından elde edilen sonuçlar, grafen oksidin hemolitik aktivitesinin yüksek olduğunu bununla birlikte yoğun sıkıştırılmış grafen tabakalarının az yoğun grafen oksit tabakalarına oranla fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (Liao vd. 2011).

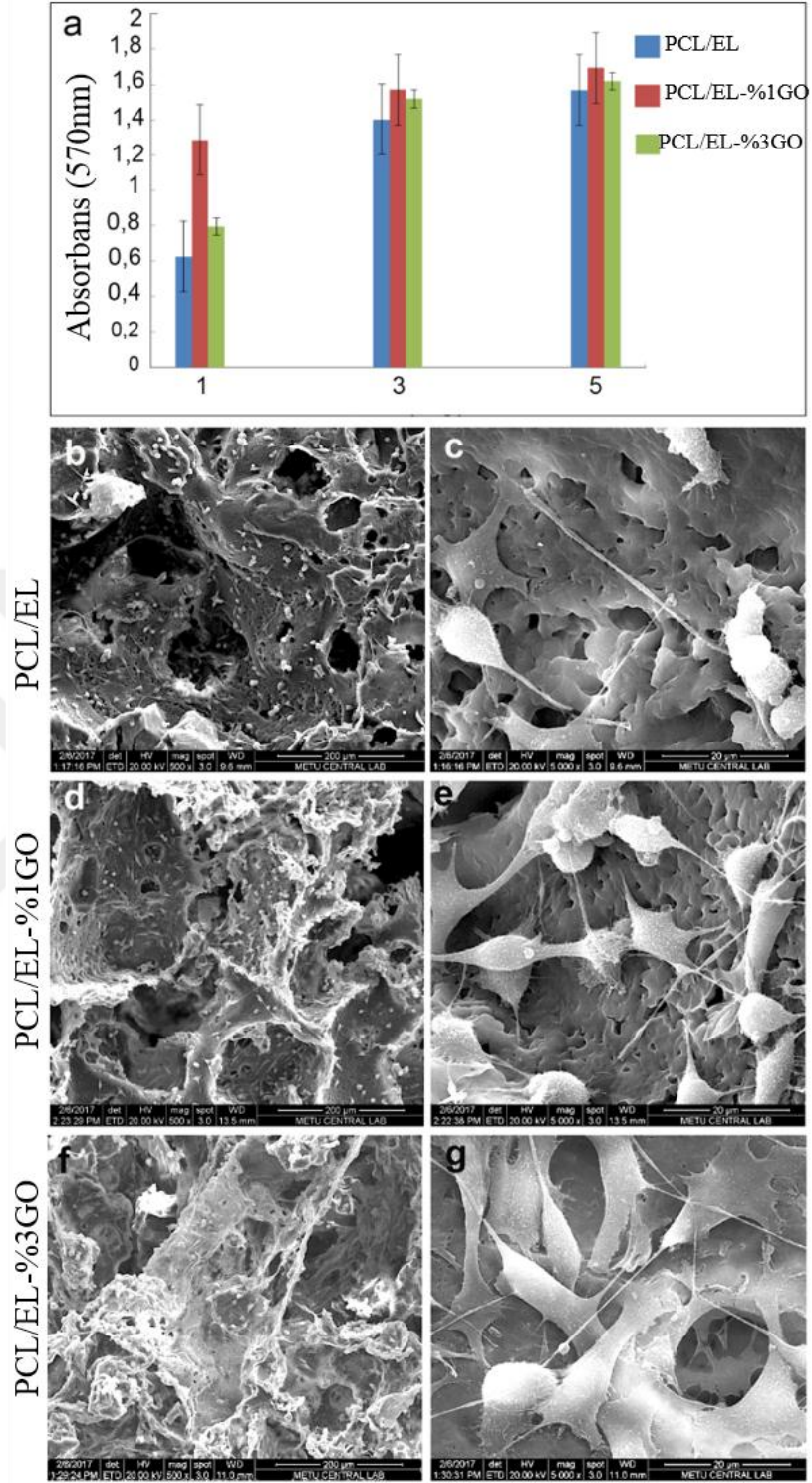
Horvath ve arkadaşları yaptıkları araştırmada grafen ve türevlerinin akciğer hücreleri üzerindeki toksisitesini incelemişlerdir. Grafen oksidin toksik davranışını 'hafif sitotoksik' olarak tanımlamışlar ve karbon nanotüplere oranla epitel hücreler ve makrofajlar üzerinde daha az toksik etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Horvath vd. 2013).

Grafen ve grafen oksidin deri keratinosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, birkaç tabakalı grafen yapısının grafen oksit yapılarla oranla en az toksik gösterdiği sonucuna varılmıştır. Oksidasyon derecesi yüksek olan grafen oksit yapıların mitokondri ve plazma membranında en fazla oranda hasara yol açtığı bulunmuştur (Pelin vd. 2016).

Grafen oksit yapısında bulunan ve oksijen içeren grupların yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olması grafen oksidi biyolojik uygulamalar için çekici hale getirmektedir (Bressan vd. 2014). Grafen oksidin kök hücrelerin farklılaşmasını etkileyen protein molekülleri için bir platform oluşturduğu bildirilmiştir (Song vd. 2015).

Fare kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile yürütülen bir çalışmada PCL/GO biyokompozit nanofiberler üzerindeki hücre yapışmasının ve yayılmasının saf PCL yapılarıdakine oranla üstün bir artış gösterdiği ve hücrelerin osteoblastik farklılaşmasını tetiklediği bulunmuştur (Song vd. 2015).

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, L-929 fare fibroblastları ile yürütülen deneylerde, tüm doku iskelelerinin (PCL, PCL-% 1GO ve PCL-% 3GO) hücre yapışması ve üremesini desteklediği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16.a.5 günlük hücre kültürü çalışmaları sonunda EL çözücüsü kullanılarak hazırlanan PCL, PCL-% 1GO ve PCL-% 3GO doku iskelelerinin MTT sonuçları, b. PCL, 500×, c. PCL, 5000×, d. PCL-% 1GO, 500×, e. PCL-% 1GO, 5000×, f. PCL-% 3GO, 500×, g. PCL-% 3GO, 5000×

MTT analizlerinden elde edilen bu sonuç, % 1 ve % 3 (w/v) oranlarında PCL yapısına eklenen GO yapısının toksik etkiye neden olmadığını açıkça göstermektedir. Hücre üremesinde istatistiksel olarak farklı bulunan tek değer 1. günde PCL-% 1GO doku iskelelerinden elde edilen değerdir. Doku iskelelerinin hücre yapışmasını destekleyip desteklemediği ve hücrelerin morfolojik yapılarını koruyup koruyamadıklarının belirlenmesi amacıyla yürütülen SEM analizlerine ilişkin sonuçlar şekil 4.17’de sunulmuştur. PCL ve PCL-GO doku iskeleleri üzerinde 5 gün süreyle kültüre edilen L-929 fibroblastlarının SEM görüntüleri incelendiğinde, tüm doku iskelelerinde hücrelerin fibroblastik morfolojilerini korudukları görülmüştür. Bununla birlikte PCL-GO doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin yayılma davranışının arttığı ve GO varlığında hücreler ile doku iskeleleri arasında güçlü bir etkileşim olduğu görülmektedir. Hücre etkileşimi ve yayılmasındaki bu artış artan GO derişimiyle doğru orantılıdır (Şekil 4.16).

5. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında uygun gözenek yapısına sahip polikaprolakton ve polikaprolakton-grafen oksit doku iskelelerinin $skCO_2$ ortamında elde edilmesi ve karakterizasyonu ile kemik doku mühendisliği alanındaki kullanımı değerlendirilmiştir. Süperkritik CO_2 destekli faz ayırımı yöntemi kullanılarak farklı grafen oksit oranlarında en uygun proses koşulları belirlenmiştir.

Bu kısımda tez çalışmasında elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

- ✓ $skCO_2$ destekli faz ayırımı kullanılarak farklı çözücülerle (1-4 dioksan, hekza florozopropanol (HFIP), diklorometan (DCM) ve etil laktat (EL)) ve farklı proses koşullarında (150-165 bar basınç, 35 °C-45 °C sıcaklık ve 2-2.5 saat difüzyon/çözücü uzaklaştırma süreleri) polikaprolakton doku iskeleleri hazırlanmıştır. Kullanılan çözücülerden 1-4 dioksan ve HFIP ile istenilen sonuçlar elde edilememiştir. DCM ve EL çözücülerini kullanıldığında uygun 3-boyutlu yapı ve gözeneklilik ile içsel bağlantılı gözenekler elde edilmiştir. Proses koşullarından 45 °C'nin polimerin camsı geçiş sıcaklığına yakın olmasından ve polimerin yapısında bozulmaya sebep olma durumundan dolayı optimum değer 35 °C alınmıştır. Proses süresi 2 saat difüzyon-2 saat çözücü uzaklaştırma olarak belirlenmiştir. Ancak literatürden yapılan birtakım araştırmalardan sonra 2.5 saat difüzyon-2.5 saat çözücü uzaklaştırma sürelerinde $skCO_2$ yapıya daha fazla nüfuz ettiği için doku iskelelerinin morfolojik yapıları açısından daha uygun olduğu görülmüştür.
- ✓ $skCO_2$ destekli faz ayırımı kullanılarak polikaprolakton-grafen oksit doku iskeleleri EL ve DCM çözücülerinde hazırlanmıştır. Grafen oksit miktarı polimer ağırlığının % 1 ve % 3'ü kadar alınmıştır. Grafen oksit, grafit oksitin ilgili çözücüde sonikasyonu ile hazırlanmıştır. Sonikasyonda DCM kullanıldığında grafen oksidin DCM'nin yapısında dağılmayıp koagüle olduğu görülmüştür. Bu yüzden grafen oksit ile kompozit doku iskeleleri hazırlanırken sadece EL çözücüsü kullanılan çalışmalardan istenilen sonuçlar alınmıştır.

- ✓ Elde edilen polikaprolakton ve polikaprolakton-grafen oksit doku iskelelerinin kimyasal yapı analizi Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR-ATR) ile gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde polikaprolakton-grafen oksit doku iskelelerinin yapısında grafen oksit pikine rastlanmamıştır. GO katkılı PCL doku iskelesinin kimyasal yapısında hiçbir değişim olmadığı, spektrumdaki tüm piklerin PCL spektrumundan elde edilen pikler ile aynı dalga sayısında olduğu görülmüştür. FTIR spektrumlarından elde edilen bu sonuç, GO yapısının PCL içerisinde yalnızca fiziksel karışma yoluyla dağıldığını ve PCL ile GO arasında bir kimyasal reaksiyon oluşmadığını göstermektedir.
- ✓ PCL-GO doku iskelelerinin yüzey kimyasının incelenmesi için Raman Spektroskopisi analizi yapılmıştır. Raman Spektroskopisi analizinde PCL-GO kompozitinin yapısında grafen oksidin karakteristik pikleri olan D ve G bantları görülmüştür. Bunun sonucunda grafen oksidin PCL-GO kompozitinin yapısına katıldığı doğrulanmıştır.
- ✓ PCL ve PCL-GO doku iskelelerinin morfolojik yapılarının belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi gerçekleştirilmiştir. SEM analizinden alınan görüntülerden gözenek çapı jmicrovision programıyla hesaplanmış ve doku mühendisliği için madde giriş-çıkışına uygun gözenek çapı ve gözenekliliğe sahip olduğu görülmüştür.
- ✓ Grafen oksidin PCL-GO kompozit yapısının kristalitesine etkisini belirlemek amacıyla X-Işınları Kırınımı (XRD) analizi gerçekleştirilmiştir. PCL'ye ait pikler 21.3° ve 23.7° 'de, grafen okside ait karakteristik pik ise 11.3° 'de görülmektedir. Grafen oksidin eklenmesi PCL'nin 21.3° pikinde azalmaya neden olmuştur. Buradan PCL-GO kompozitinin kristalitesini azalttığı sonucu çıkarılmıştır.
- ✓ Grafen oksidin sonikasyon sırasında tabakalarına ayrılıp ayrılmadığı geçirimli elektron mikroskobuyla (TEM) incelenmiştir. TEM görüntüleri incelendiğinde birkaç katman halinde grafen oksidin tabakaları dikkat çekmiştir. Bunun sonucunda grafen oksidin ultrasonik banyoda sonikasyon sırasında tabakalarına ayrılması işleminin verimli bir şekilde gerçekleştiği düşünülmüştür.
- ✓ PCL-GO doku iskelelerinin termal özelliklerini belirlemek amacıyla Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) analizi yapılmıştır. DSC

termogramından GO'nun PCL'nin yapısına eklenmesinin kompozitin erime noktasını değiştirmediği 60°C'ta kaldığı gözlemlenmiştir. Grafen oksidin çekirdekleşme etkisinden dolayı kristalizasyon sıcaklığı PCL-GO kompoziti için artmıştır.

- ✓ Elde edilen doku iskeleleri üzerinde hücre kültürü çalışmaları yürütölüp, MTT testi yapılmıştır. Belirli günlerde yapılan ölçümler sonucunda hücrelerin canlılığı incelenmiş ve hücre ölümü ile yapılarındaki herhangi bir değişim görümemiştir. Bunun sonucunda grafen oksidin hücreler üzerinde toksik bir etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.
- ✓ Sonuç olarak, gerçekteştirilen tez çalışması kapsamında doku mühendisliğinde kullanılmak üzere polikaprolakton ve polikaprolakton-grafen oksit doku iskeleleri süperkritik CO₂ destekli faz ayrımı yöntemiyle elde edilmiştir. Faz ayrımı/partikül uzaklaştırma yönteminin doku iskelesi hazırlanmasında kullanılabileceği sonucu çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

- Annabi, N., Mithieux, S.M., Weiss, A.S. and Dehghani, F. 2009. The fabrication of elastin-based hydrogels using high pressure CO₂, *Biomaterials*, Vol: 30; pp. 1-7.
- Anonymous. 2010. Web Sitesi: <https://www.wikipedia.org/wiki/Bioceramic>, Erişim Tarihi: 06/09/2010.
- Anonymous. 2013. Web Sitesi: https://www.researchgate.net/figure/256838030_The-three-essential-components-that-make-up-the-tissue-engineering-triad, Erişim Tarihi: 22/05/2014.
- Anonymous. 2017a. Web Sitesi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10965-017-1286-4>, Erişim Tarihi: 20.07.2017.
- Anonymous. 2017b. Web Sitesi: <http://www.mdpi.com/2077-0375/7/3/52>, Erişim Tarihi: 12/09/2017.
- Anonymous. 2017c. Web Sitesi: https://www.researchgate.net/post/Is_there_a_study_that, Erişim Tarihi: 04/03/2017.
- Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S. and Kenny, J.M. 2010. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polymer Degradation and Stability*, Vol: 95; pp. 2126-2146.
- Barton, A.F.M. 2017. *CRC Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters: 2nd Edition*.
- Bhardwaj, N. and Kundu, S.C. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, Vol: 28; pp. 325-347.
- Borum-Nicholas, L. and Wilsan, Jr OC. 2003. Surface modification of hidroxyapatite. Part 1. Dodecyl alcohol., *Biomaterials*, Vol: 24 pp. 3671-9.
- Bressan, E., Ferroni L., Gardin, C., Sbricoli, L., Gobbato, L., Ludovichetti, F.S., Tocco, I., Carraro, A., Piattelli, A. and Zavan, B. 2014. Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment, *Journal of Translational Medicine*, Vol: 12; pp. 1-15.
- Butler, R., Davies, C.M. and Cooper, A.I. 2001. Emulsion templating using high internal phase supercritical fluid emulsions, *Advanced Materials*, Vol: 13; pp. 1459-1463.
- Campardelli, R., Baldino, L. and Reverchon, E. 2015. Supercritical fluids applications in nanomedicine, *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 101; pp. 193-214.
- Chaudhuri, B., Bhadra, D., Mondal, B. and Pramanik, K. 2014. Biocompatibility of electrospun graphene oxide/poly(ϵ -caprolactone) fibrous scaffolds with human cord blood mesenchymal stem cells derived skeletal myoblast, *Materials Letters*, Vol: 126; pp. 109-112.
- Choi, J.S., Lee, S.J., Christ, G.J., Atala, A. and Yoo, J.J. 2008. The Influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes., *Biomaterials*, vol: 29; pp. 2899-906.
- Chu, H.J., Lee, C.Y. and Tai, N.H. 2014. Green reduction of graphene oxide by *Hibiscus sabdariffa* L. to fabricate flexible graphene electrode, *Carbon*. Vol: 80; pp. 725-733.
- Dai, N.T., Williamson, M.R., Khammo, N., Adams, F. and Coombes, A.G.A. 2004. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin., *Biomaterials*., Vol: 25; pp. 4263-71.

- Deng, A., Chen, A., Wang, S., Li, Y., Liu, Y., Cheng, X. and Zhao, Z., Lin, D. 2013. Porous nanostructured poly-L-lactide scaffolds prepared by phase inversion using supercritical CO₂ as a nonsolvent in the presence of ammonium bicarbonate particles., *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 77; pp. 110-116.
- Depan, D., Girase, B., Shah, J.S. and Misra, R.D.K. 2011. Structure-process-property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds, *Acta Biomaterialia*, Vol: 7; pp. 3432-3445.
- Diban, N., Gonzalez, S.S., Diez, M.L., Vivaz, J.R. and Urriaga A. 2017. Facile fabrication of poly(ϵ -caprolactone)/graphene oxide membranes for bioreactors in tissue engineering, *Journal of Membrane Science*, Vol: 540; pp. 219-228.
- Dinescu, S., Ionita, M., Pandele, M.A., Galetanu, B., Iovu, H., Ardelean, A., Costache, M. and Hermenean, A. 2014. In vitro cytocompatibility evaluation of chitosan /graphene oxide 3D scaffold composites designed for bone tissue engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*, Vol: 24; pp. 2249-2256.
- Duarte, C., Mano, J.F. and Reis, R.L. 2012. The role of organic solvent on the preparation of chitosan scaffolds by supercritical assisted phase inversion, *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 72 pp. 326-332.
- Fan, H., Wang, L., Zhao, K., Li, N., Shi, Z., Ge, Z. and Jin, Z. 2010. Fabrication, mechanical properties and biocompatibility of graphene-reinforced chitosan composites, *Biomacromolecules*, Vol: 11; pp. 2345-2351.
- Girard, E., Tassaing, T., Marty, J.D. and Destarac, M. 2016. Structure-property relationships in CO₂-philic (Co)polymers: Phase behavior, self assembly and stabilization of water/CO₂ emulsions, *Chemical Reviews*, Vol. 116; pp. 4125-4168.
- Gualandi, C., Chen, L., White, L.J. and Scandola, M. 2009. Scaffold for tissue engineering fabricated by non-isothermal supercritical carbon dioxide foaming of a highly crystalline polyester, DOI: 10.1016/j.actbio.2009.07.020, PubMed.
- Gürbüz, S., Demirtaş, T.T., Yüksel, E., Karakeçili, A. and Doğan, A. 2016. Gümüşderelioğlu M., Multi-layer functional membranes for periodontal regeneration: Preparation and characterization, *Materials Letters*, Vol: 178; pp. 256-259.
- Hoffman, A., Ratner, B., Schoen, F. and Lemons, J. 2013. *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd edition, Academic Press.
- Hong, Z., Zhang, P., He, C., Qui, X., Liu, A. and Chen, L. 2005. Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility, *Biomaterials*, Vol: 26 pp. 6296-304.
- Horvath, L., Magrez, A., Burghard, M., Kern, K., Forro, L. and Schwaller, B. 2013. Evaluation of the toxicity of graphene derivatives on cells of the lung luminal surface, *Carbon*, Vol: 64; pp. 45-60.
- Huang, X., Yin, Z., Wu, S., Qi, X., He, Q., Zhang, Q., Yan, Q., Boey, F. and Zhang, H. 2011. Graphene-based materials: Synthesis, characterization, properties and applications, *Small*, Vol: 14; pp. 1876-1902.
- Jiang, L., Shen, X.P., Wu, J.L. and Shen, K.C. 2010. Preparation and characterization of graphene/poly(vinyl alcohol) nanocomposites, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol: 118; pp. 275-279.

- Jing, X., Mi, H.Y., Napiwocki, B.N., Peng, X.F. and Turng, L.S. 2017. Mussel-inspired electroactive chitosan/graphene oxide composite hydrogel with rapid self-healing and recovery behavior for tissue engineering, *Carbon*, Vol: 125; pp. 557-570.
- Kim, N.H., Khanra, P., Kuila, T., Jang, D. and Lee, J.H. 2013. Efficient reduction of graphene oxide using Tin-powder and electrochemical performances for use as an energy storage electrode material, *Journal of Materials Chemistry*, Vol:1; pp. 1349-1358.
- Langer, R. and Vacanti J.P. 1993. *Tissue Engineering. Science*. Vol. 60; pp. 920-926.
- Lee, K., Silva, E.A. and Mooney, D.J. 2011. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments, *Journal of The Royal Society*, Vol:8; pp. 153-170.
- Levit, N. and Tepper, G. 2004. Supercritical CO₂-assisted electrospinning, *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 31; pp. 329-333.
- Li, W.J., Danielson, K.G., Alexander, P.G. and Tuan, R.S. 2003. Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds., *Journal of Biomedical Materials Research Part A.*, Vol: 67; pp. 1105-14.
- Liao, K.H., Lin, Y.S., Macosko, C.W. and Haynes, C. 2011. Cytotoxicity of graphene oxide graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts, *ACS Applied Materials and Interfaces*, Vol: 3; pp. 2607-2615.
- Luo, Y., Shen, H., Fang Y., Cao, Y., Huang, J., Zhang, M., Dai, J., Shi, X. and Zhang, Z. 2015. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on graphene oxide-incorporated electrospun poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibrous mats, *Applied Materials and Interfaces*, Vol: 7; pp. 6331-6339.
- Mathieu, L.M., Mueller, T.L., Bourban, P.E., Pioletti, D.P., Müller, R., Anders, J. and Manson E. 2006. Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, Vol: 17; pp. 905-916.
- Mi, H.Y., Jing, X. and Turng, L.S. 2015. Fabrication of porous synthetic polymer scaffolds for tissue engineering, *Journal of Cellular Plastics*, Vol. 51; pp. 165-196.
- Mondal, D., Griffith, M. and Venkatraman, S.S. 2015. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, Vol. 65; pp. 255-265.
- Mou, Z.L., Zhao, L.J., Zhang, Q.A., Zhang, J. and Zhang, Z.Q. 2011. Preparation of porous PLGA/HA/collagen scaffolds with supercritical CO₂ and application in osteoblast cell culture, *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 58; pp. 398-406.
- Murphy, M.B. and Mikos, A.G. 2007. *Polymer Scaffold Fabrication*, Chapter twenty-two.
- Murphy, C.M., Brien, F.J., Little, D.G. and Schindeler, A. 2013. Cell-Scaffold Interactions In *The Bone Tissue Engineering Triad*, *European Cells and Materials*, Vol. 26; pp. 120-132.
- Murray, E., Sayyar, S., Thompson, B.C., Gorkin, R., Officer, D.L. and Wallace, G.G. 2015. A bio-friendly, green route to processable biocompatible graphene/polymer composites, *Royal Society of Chemistry*, Vol: 5; pp. 45284-45290.
- Naderi, H., Matin, M.M. and Bahrami, A.H. 2011. Review paper: Critical issues in tissue engineering: Biomaterials, cell sources, angiogenesis and drug delivery systems, *Journal of Biomaterials Applications*, Vol. 26; pp. 383-417.

- Nam, Y.S. and Park, T.G. 1999. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation, John Wiley & Sons.
- Noh, M., Kim, S.H., Kim, J., Lee, J. R., Jeong, G.J., Yoon, J.K., Kang, S., Bhang, S.H., Yoon, H.H., Lee, J.C., Hwang, N.S. and Kim, B.S. 2017. Graphene oxide reinforced hydrogels for osteogenic differentiation of human-adipose derived stem cells, Royal Society of Chemistry, Vol: 7; pp. 20779-20788.
- Paul, S. Pradhan, K. and Das, A.R. 2016. Ethyl lactate as a green solvent: A promising biocompatible media for organic synthesis. *Current Green Chemistry*. Vol: 3; pp. 111-118.
- Patel, H., Bonde, M. and Srinivasan, G. 2011. Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering, *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, Vol: 25; pp. 20-29.
- Pelin, M., Fusco, L., Leon, V., Martin, C., Criado, A., Sosa, S., Vasquez, E., Tubaro, A. and Prato, M. 2016. Differential cytotoxic effects of graphene and graphene oxide on skin keratinocytes, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep40572.
- Peltola, S.M., Melchels, F.P.W., Grijpma, D.W. and Kellomaki, M. 2008. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes, *Annals of Medicine*, Vol: 40; pp. 268-280.
- Phillipson, K., Hay, J.N. and Jenkins, M.J. 2014. Thermal analysis of FTIR spectroscopy of poly(ϵ -caprolactone), *Thermochimica Acta*, Vol: 595; pp. 74-82.
- Reverchon, E. and Cardea, S. 2012. Supercritical fluids in 3-D tissue engineering, *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 69; pp. 97-197.
- Saçak, M. 2012. *Polimer Kimyası*. Gazi Kitabevi. 6. Baskı
- Salerno, A. and Domingo, C. 2014. Making microporous nanometre-scale fibrous PLA aerogels with clean and reliable supercritical CO₂ based approaches. *Microporous and Mesoporous Materials*. Vol: 184; pp. 162-168.
- Salerno, A., Clerici, U. and Domingo, C. 2014. Solid-state foaming of biodegradable polyesters by means of supercritical CO₂/ethyl lactate mixtures: Towards designing advanced materials by means of sustainable processes. *European Polymer Journal*. Vol: 51; pp. 1-11.
- Salerno, A., Zeppetelli, S., Maio, E.D., Iannace, S. and Netti, P.A. 2010. Novel 3-D porous multi-phase composite scaffolds based on PCL, thermoplastic zein and HA prepared via supercritical CO₂ foaming for bone regeneration, *Composites Science and Technology*, Vol: 70; pp. 1838-1846.
- Salerno, A., Gutierrez, M.F., Barrio, J.S.R. and Domingo, C. 2015. Bio-safe fabrication of PLA scaffolds for bone tissue engineering by combining phase separation and porogen leaching and scCO₂ drying., *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 97; pp. 238-246.
- Sayyar, S., Murray, E., Thompson, B.C., Gambhir, S., Officer, D.L. and Wallace, G.G. 2013. Covalently linked biocompatible graphene /polycaprolactone composites for tissue engineering, *Carbon*, Vol: 52; pp. 296-304.
- Schnell, E., Klinkhammer, K., Balzer, C., Brook, G., Klee, D. and Dalton, P. 2007. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend. *Biomaterials*., Vol: 28; pp. 3012-25.

- Shen, H., Fang, Y., Cao, Y., Huang, J., Zhang, M., Dai, J., Shi, X. and Zhang, Z. 2015. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on graphene oxide-incorporated electrospun poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibrous mats, *ACS Applied Materials and Interfaces*, Vol: 7; pp. 6331-6339.
- Shin, S.R., Li, Y.C., Jang, H.L., Khoshakhlagh, P., Akbari, M., Nasajpour, A., Zhang, Y.S., Tamayol, A. and Khademhosseini A. 2016. Graphene-based materials for tissue engineering., *Advanced Drug Delivery Reviews.*, Vol: 105; pp. 255-274.
- Siva, A.P. and Ansari, M.N.M. 2015. A review on bone scaffold fabrication methods, *International Research Journal of Engineering and Technology*, Vol: 2; pp. 1232-1236.
- Smeds K.A. and Grinstaff M.W. 2001. Photocrosslinkable polysaccharides for *in situ* hydrogel formation, *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol: 54; pp. 115-121.
- Song, J., Gao, H., Zhu, G., Cao, X., Shi, X. and Wang, Y. 2015. The preparation and characterization of polycaprolactone/graphene oxide biocompatible nanofiber scaffolds and their application for directing cell behaviors, *Carbon*, Vol: 95; pp. 1039-1050.
- Subia, B., Kundu, J. and Kundu, S.C. 2010. Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications.
- Sultana, N. and Khan, T.H. 2013. Polycaprolactone scaffolds and hydroxyapatite/polycaprolactone composite scaffolds for bone tissue engineering, *Journal of Bionanoscience*, DOI: 10.1166/jbns.2013.1112.
- Tai, H., Mather, M.H., Howard, D., Wang, W., White, L.J., Crowe, J.A., Morgan, S.P., Chandra, A., Williams, D.J., Howdle, S.M. and Shakesheff, K.M. 2007. Control of pore size and structure of tissue engineering scaffolds produced by supercritical fluid processing., *European Cells and Materials.*, Vol: 14; pp. 64-77.
- Tsiptsias, C. and Panayiotou, C. 2008. Foaming of chitin hydrogels processed by supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 47.
- Tsivintzelis, I., Marras, S.I., Zuburtikudis, I. and Panayiotou, C. 2007. Porous poly(L-lactic acid) nanocomposite scaffolds prepared by phase inversion using supercritical CO₂ as antisolvent, *Polymer*, Vol: 48; pp. 6311-6318.
- Unnithan, A.R., Sasikala, A.R.K., Park, C.H. and Kim, C.H. 2017. A unique scaffold for bone tissue engineering: An osteogenic combination of graphene oxide/hyaluronic acid-chitosan with simvastatin, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Vol: 46; pp. 182-191.
- Van Lieshout, M., Peters, G., Rutten, M. and Baaijens F. 2006. A knitted, fibrin-covered polycaprolactone scaffold for tissue engineering of the aortic valve., *Tissue Engineering.*, Vol: 12.; pp. 481-7.
- Van Lieshout, M.I., Vaz, C.M., Rutten, M.C.M. and Peters, G.W.M., Baaijens F.B.T., 2006. Electrospinning versus knitting: two scaffolds for tissue engineering of the aortic valve., *Journal of Biomaterials Applied Polymer Edition.*, Vol: 17; pp. 77-89.
- Van Lieshout, M.I. 2005. Tissue engineered aortic valves based on a knitted scaffold. PhD Dissertation. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven ; pp. 1-93.
- Woodard, R., Hilldore, A.J., Lan, S.K., Park, C.J., Morgan, A.W. and Eurell, J.A.C. 2007. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity, *Biomaterials*, Vol: 28; pp. 45-54.

- Woodruff, M.A. and Hutmacher, D.W. 2010. The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science*, Vol. 35; pp. 1217-1256.
- Yang, C., Kang, Y.Q., Liao, X.M., Yao, Y.D., Huang, Z.B. and Yin, G.F. 2010. Preparation of PLGA/ β -TCP composite scaffolds with supercritical CO₂ foaming technique., *Frontiers of Materials Science*, Vol: 4; pp. 314-320.
- Yang, Y., Asiri, M.A., Tang, Z., Du, D. and Lin, Y. 2013. Graphene based materials for biomedical applications, *Materials Today*, Vol. 16; pp. 365-373.
- Yang, J., Wu, M., Chen, F., Fei, Z. and Zhong, M. 2011. Preparation, characterization and supercritical carbon dioxide foaming of polystyrene/graphene oxide composites, *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 56; pp. 201-207.
- Yıldırım, S., Demirtaş, T.T., Dinçer, C., Yıldız, N. and Karakeçili, A. 2018. Preparation of polycaprolactone / graphene oxide scaffolds: A green route combining supercritical CO₂ technology and porogen leaching, *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 133; pp. 156-162.
- Zohora, F.T. and Azim, A.Y.M.A. 2014. Biomaterials as porous scaffolds for tissue engineering applications: A review, *European Scientific Journal*, Vol:10; pp. 186-200.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Simge YILDIRIM
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 20.07.1991
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise : Ankara Bahçelievler Anadolu Lisesi (2009)
Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2014)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (Şubat 2015-Haziran 2018)

Hakemli Dergi:

Yıldırım S., Demirtaş T.T., Dinçer C.A., Yıldız N., Karakeçili A. 2018. Preparation of polycaprolactone/graphene oxide scaffolds: A green route combining supercritical CO₂ technology and porogen leaching., The Journal of Supercritical Fluids, Vol: 133, pp; 156-162.

Ulusal Kongre Sunum:

12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK2016)- Poster Sunumu