MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

3 BOYUTLU YAZICI İLE ANTİMİKROBİYAL MANGAN KATKILI KEMİK DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

MÜGE KOYUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

METALURJİ VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ

DANIŞMAN

Dr.Öğr.Üyesi SONGÜL ULAĞ

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. OĞUZHAN GÜNDÜZ

İSTANBUL, 2023

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans öğrencisi Müge KOYUN' un "**3 BOYUTLU YAZICI İLE ANTİMİKROBİYAL MANGAN KATKILI KEMİK DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**" başlıklı tez çalışması, 21.09.2023 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Songül ULAĞ (Danışman)
Marmara Üniversitesi ..... (İMZA).....

Doç. Dr. Nazmi EKREN (Üye)
Marmara Üniversitesi ..... (İMZA).....

Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ (Üye)
Marmara Üniversitesi ..... (İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …….. tarih ve …… sayılı kararı ile Müge KOYUN 'un Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümünde Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Adı SOYADI

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimi yazarken, her zaman beraber çalışmaktan gurur duyduğum, paylaştığı bilgi ve birikiminden ve sunduğu laboratuvar imkanlarından dolayı değerli hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Songül Ulağ'a ve bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Oğuzhan Gündüz'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen en büyük destekçilerim olan anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yüksek lisans öğrenimim boyunca ve hayatımın her aşamasında yanımda olan çok değerli ablam Özge'ye ve kardeşim Muhammet'e;her daim beni motive eden, anılar biriktirdiğim, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen hayatımın her evresinde yanımda olmalarını istediğim Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi (NBUAM) ekibine çok teşekkür ederim.
Ayrıca tüm Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi (NBUAM) ekibine teşekkür ederim.

MÜGE KOYUN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ……i

ÖZET. ……iv

ABSTRACT……v

SEMBOLLER……vi

KISALTMALAR……vii

ŞEKİLLER……viii

TABLO LİSTESİ……ix

1.GİRİŞ……1

1.1.Kemik hasarı ve Tedavi yöntemleri……1
1.2.Kemik doku……2
1.3.Doku mühendisliği……5
1.4. Kemik doku mühendisliği……6
1.4.a.Kemik Doku İskelelerinin Özellikleri……7
1.5. Yapay Kemik İskelelerinin Üretim Yöntemleri……7
1.5.a.Elektroeğirme……8
1.5.b.Dondurarak kurutma……8
1.5.c.Gaz Köpürtme……9
1.5.d.3B Biyobaskı……9
1.6.Kemik Dokuda Kullanılan Malzemeler……10
1.6.a.Sodyum Aljinat……10
1.6.b.Hidroksiapatit……12
1.7. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Elementler……13
1.7.a.Mangan……14

2.MATERYAL ve YÖNTEM……17

2.1. Materyal……17
2.2. Yöntem……17
2.2.1.Kemik Yapısını Oluşturacak olan Seramik Kompozit Biyomürekkebin Hazırlanması……18
2.2.2.Hazırlanan Seramik Kompozit Biyomürekkebin Reolojik Özelliklerinin Analiz Edilmesi……19
2.2.3.Üç Boyutlu Kemik Doku İskelelerinin Basımının Tasarımının Yapılması ve STL Formatına Dönüştürülmesi……19
2.2.4.Üç Boyutlu Yazıcı ile Üç Boyutlu Kemik Doku İskelelerinin Oluşturulması..20
2.2.5.Üretilen İskelelerin Çapraz Bağlama İşlemi ……21
2.2.6. Üretilen Kemik Doku İskelelerinin Karakterizasyonunun Yapılması……...21
2.2.6.a.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ……..21
2.2.6.b.Fourier Dönüşümü-Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analizi…….22
2.2.6.c. X-Işını Kırınımı (XRD) ……...23

2.2.6.d. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ……..……..……..24
2.2.6.e. Mekanik Analiz……..……..……..……24
2.2.6.f. Antimikrobiyal Aktivite Testi ……..……..…….25
2.2.6.g. Hücre Kültürü Testleri…..……..……..……..…25

3. BULGULAR ve TARTIŞMA……..……....26

3.1. Morfolojik Yapı Analizi…….…….....26
3.2. Kimyasal Yapı Analizi…….…….....30
3.3. Termal Yapı Analizi…….…….....31
3.4. X Işınları Difraktometresi Analizi…….…….....32
3.5. Mekanik Analiz…….…….....33
3.6.Antibakteriyel Test…….…….....34
3.7. Hücre Kültürü Analizi…….…….....36

4. SONUÇLAR…….…….....39

5. KAYNAKLAR…….…….....40

ÖZET

Travma ve kaynamama nedeniyle oluşan kemik defektlerinin tedavisi ortopedide klinik bir zorluk olmaya devam etmektedir. Kemik doku mühendisliği, farklı hücre, büyüme faktörleri ve biyomateryal kombinasyonları ile doğal kemiği taklit eden ve kusurların tedavisini hızlandıran yapılar geliştirmeyi amaçlar. Bu araştırmada, kemik defektlerinin tedavisi için 3D baskılı sodyum aljinat (SA), hidroksiapatit (HA) ve mangan (Mn) mikro gözenekli kompozit yapılar başarıyla geliştirilmiştir. Doğal kemiğin ana bileşeni olan HA, osteoblast proliferasyonunu uyaran ve mezenkimal kök hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını destekleyen Ca^{+2} seviyelerini arttırabilir. Mn, osteoblast proliferasyonunu iyileştirirken, iskelenin mekanik ve termal stabilitesini arttırır. Önceki çalışmalar, Mn' nin osteokalsin stimülasyonunu arttırdığını, kolajen tip I üretimini iyileştirdiğini ve hücre dışı matrisin kendisini yeniden şekillendirmesine yardımcı olduğunu göstermiştir. Mn' nin antibakteriyel özelliği, gram pozitif ve negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların üstesinden gelecektir. Bu çalışmada, hassas ayarlamalar sağlayan 3D yazıcı teknolojisi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (0.2 ,0.6, ve 1 gr) Mn yüklü iskeleler üretilmiştir. Gözenek boyutu; damarlanma, kemik oluşumu ve hücre dışı matrisin üretiminde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle dolgu yoğunluğu %40'a ayarlanmış ve iğne çapı 22G olup 580 – 600 µm gözenek boyutu elde edilmiştir. Üretilen iskelelerin mekanik (basma testi), biyolojik ve kimyasal (FTIR) özellikleri incelenmiştir. Analizler, elde edilen kemik doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için alternatif bir seçenek oluşturabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Hidroksiapatit, kemik doku mühendisliği, mangan, sodyum aljinat, 3B basılmış iskeleler.

ABSTRACT

Treatment of bone defects caused by trauma and nonunion remains a clinical challenge in orthopedics. Bone tissue engineering aims to develop structures that mimic natural bone and accelerate the treatment of defects with different combinations of cells, growth factors, and biomaterials. In this research, 3D-printed sodium alginate (SA), hydroxyapatite (HA) and Mangan (Mn) microporous composite structures were successfully developed for the treatment of bone defects. The main component of the natural bone, HA can increase Ca^{+2} levels stimulating osteoblast proliferation and promoting the growth and differentiation of mesenchymal stem cells. Mn enhances the mechanical and thermal stability of the scaffold while improving osteoblast proliferation. Previous studies have shown that Mn enhances osteocalcin stimulation, improves collagen type I production, and helps the extracellular matrix remodel itself. The antibacterial property of the Mn will overcome infections that are caused by gram-positive and negative bacteria. In this study, Mn-loaded scaffolds in different concentrations (0.2, 0.6, 1 gr) were produced using 3D printer technology that provides precise adjustments. Pore size plays a crucial role in vascularisation, bone formation, and production of the extracellular matrix. Therefore infill density was adjusted to 40% and the nozzle diameter was 22G resulting in 580 – 600 μm pore size. The mechanical (compression test), biological, and chemical (FTIR) properties of the produced scaffolds were investigated to analyze their compatibility with natural bone. The analyses have shown that the obtained bone tissue scaffolds can constitute an alternative option for bone tissue engineering applications.

Keywords: Bone tissue engineering, hydroxyapatite, manganese, sodium alginate, 3D-printed scaffolds.

SEMBOLLER/SYMBOLS

Mn : Mangan

Zn : Çinko

Cu : Bakır

I : İyot

Mg : Magnezyum

°C : Santigrat Derece

T : Sıcaklık (°C)

µm : Micrometre

% : Yüzde

g : Gram

ml : Mililitre

mm : Milimetre

G : Ölçer

N : Newton

kV : Kilovolt

≈ : Yaklaşık

mPa : MegaPaskal

GPa : GigaPaskal

KISALTMALAR/ABBREVIATIONS

LB **:** Lysogeny Broth

TSA **:** Tryptic Soy Agar

ECM **:** Hücre Dışı Matris

BTE **:** Kemik Doku Mühendisliği

HA **:** Hidroksiapatit

SA **:** Sodyum Aljinat

Mn **:** Mangan

FTIR **:** Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

SEM **:** Taramalı Elektron Mikroskop

DSC **:** Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

CT **:** Bilgisayarlı Tomografi

CAD **:** Bilgisayar Destekli Tasarım

STL **:** Standart Üçgen Dili

ŞEKİL

Şekil 1.1. Kemik hasarı

Şekil 1.2. Kemiğin yapısı

Şekil 1.3. Doku mühendisliğinde kullanılan prosedürler

Şekil 1.4. Elektro-eğirme sistemi

Şekil 1.5. Doku mühendisliğine kullanılan 3B yazıcılar

Şekil 1.6. Sodyum aljinat

Şekil 1.7. Hidroksiapatit

Şekil 1.8. Toz halde mangan elementi

Şekil 1.9. Mn elementinin kemik hasarının iyileşmesine etkisi

Şekil 2.1. Deneyde kullanılan metodlar A) Sodyum aljinat solüsyonunun hazırlanması B) Hazırlanan solüsyona HA'nın eklenmesi C) Mn'nın elementinin hazırlanan HA-SA solüsyonuna eklenmesi D) Solüsyonun homojen bir şekilde karıştırılması E) 3B yazıcının kurulumu F) Hazırlanan biyomürekkebin basımı G) Basılan iskelenin görüntüsü H) Basılan iskelenin $CaCl_2$ solüsyonu ile çapraz bağlanması I) Kemik iskelesinin son görüntüsü J) Üretilen kemik doku iskelesinin hasarlı kemik dokuya uygulanması

Şekil 2.2. a) İskelelerin basıldığı 3B yazıcı b) İstenilen boyutlarda tasarlanmış olan şeklin STL formatına dönüştürülerek 3B yazıcının programındaki görüntüsü

Şekil 2.3. 3B yazıcıda basılmış kemik iskelelerinin görüntüsü

Şekil 2.4. Basılan kemik iskelelerine çapraz bağlanma işlemi

Şekil 2.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazı

Şekil 2.6. FTIR cihazı

Şekil 2.7. XRD cihazı

Şekil 2.8. Diferansiyel taramalı kalorimetri Shimadzu DSC60 Plus cihazı

Şekil 2.9. Shimadzu Basma Testi Cihazı

Şekil 3.1. SEM görüntüleri a) kontrol b)0.2gr Mn c)0.6gr Mn d)1gr Mn

Şekil 3.2. SEM görüntüleri

Şekil 3.3. Basılan iskelelerin katmanlı yapısını gösteren SEM görüntüleri

Şekil 3.4. FTIR spektrumu a)Sodyum Aljinat b)Hidroksiapatit c)Mangan d)Kontrol Grubu e)0.2gr Mn f)0.6gr Mn g)1gr Mn

Şekil 3.5. İskelelere ait DSC termogramları a)Kontrol Grubu b)0.2gr Mn c)0.6gr Mn d)1gr Mn

Şekil 3.6. İskelelerin XRD dağılımı a)Hidroksiapatit b)Mangan c)Kontrol Grubu d)0.2gr Mn e)0.6gr Mn f)1gr Mn
Şekil 3.7. Kuvvet-Şekil Değişimi grafiği a) 0.6gr Mn b) 1gr Mn c) 0.2gr Mn d) Kontrol grubu
Şekil 3.8. Antibakteriyel aktivite sonuçları

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Hidroksiapatitin Mekanik Özellikleri
Tablo 2.1. Formüle edilen seramik kompozit biyomürekkebin konsantrasyonları
Tablo 2.2. 3B baskı sırasında iskelelerin işlem parametreleri
Tablo 3.1. Basma testi sonuçları
Tablo 3.2. Koloni Sayım

1. GİRİŞ

1.1. Kemik Hasarı ve Tedavi Yöntemleri

Özellikle 50 yaş üzerinde görülen kemik ve kemik ile ilişkili hastalıklar klinik olarak sorun olmaya devam etmektedir [1].

Kemik yapısı belli bir düzeyde iyileşme ve yenilenme kapasitesine sahip olmasına rağmen, büyük segmental kemikte oluşan hasarların kendiliğinden iyileşmesi oldukça zordur. Yaşlılık kırık kaynamaması, kemik tümörleri, trafik kazaları gibi nedenlerle oluşan büyük kemik yaralanmaları ortopedik olarak büyük bir sorun olarak görülmektedir. Şekil 1.1'de çeşitli nedenlerden kaynaklanmış olan hasar görmüş bir kemik gösterilmiştir, Bu tarz kemik hasarlarının iyileştirilmesi ve güçlendirilmesi için kemik greftleri kullanılmaktadır.



Şekil 1.1. *Kemik hasarı*

Kemik greftleri kaynaklarına göre, kemik hasarı geleneksel olarak hastanın kendisinden elde edilen otogreftler ve bağışçılardan elde edilen allogreftler ile tedavi edilmektedir. Otogreftler, yeniden şekillenmeyi hızlandırmak amacıyla lokal olarak aktivasyon

gösteren periosteal progenitörler ve diğer kök hücreler için bir kaynak sağladıkları için çoğu doktor için ilk çözüm yoludur. Sınırlı otogreft arzı, yapısal özellikleri otogreftlere benzer, fiziksel desteğe izin veren, ancak yeniden şekillenmeye katılabilecek bir iskelet progenitör hücre kaynağına sahip olmayan allogreftlerin kullanımının artmasına yol açmaktadır. Canlılığın olmaması, allogreftler içinde hasar birikimini ve mikro çatlak yayılmasını da arttırmaktadır [2],[3],[4].

Buna ek olarak otolog kemik greftlerinin birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bunlardan bazılarına örnek verecek olursak ikincil hasarlar, yüksek donör saha morbiditesi, özel şeklin kısıtlanması, otojen kemiğin yetersizliği vb. sayılabilir. Bu durum kullanıma bu tedavi yaklaşımını sınırlandırmaktadır [5],[6].

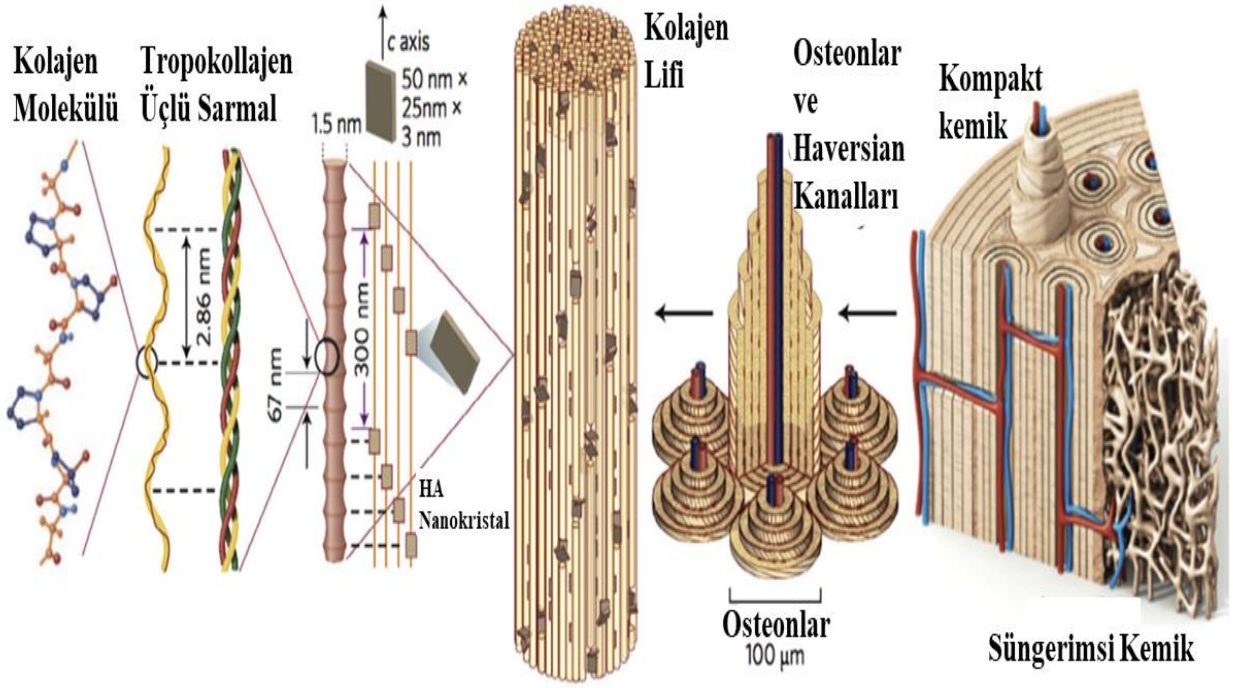
Kemik doku mühendisliği kemik hasarlarının tedavisinde kullanılmak üzere laboratuvar ortamında ikincil yaralanmaya sebep olmayan ve immun reaksiyona neden olmayan yapay kemik dokusu geliştirmeyi amaçlamaktadır [7]. Laboratuvar ortamında üretilen bu kemik doku iskeleleri biyouyumlu, osteokondüktif, osteoindüktif, biyobozunur ve yapısal olarak doğal kemiğe benzemelidir. Bunlara ek olarak üretilen kemik doku iskeleleri hücre göçü, tutunması ve yeni kemik dokusunun büyümesi için düzenli ve birbirine bağlı gözenek yapısına sahip olmalıdır [8].

1.2. Kemik Doku

Kemik hiyerarşik bir yapıya sahiptir. Dış kısmı kompakt kemiktir ve kalsiyum fosfattan oluşur. Bu kısım basınç dayanımı sağlar. İç faz süngerimsi kemik olup, osteoklastlar, osteoblastlar ve kemik oluşumunda rol oynayan hücreler gibi kemik hücrelerinin göç etmesi, çoğalması ve büyümesi için birbirine bağlı gözeneklere sahiptir. Şekil 1.2’ de kemiğin porlu bir yapıda olduğu görülmektedir, Kemik matriksi kollajenden oluşur ve yapısına gerilme mukavemeti sağlar. Kompakt ve süngerimsi kemiğin miktarı insan vücudundaki kemik tipine göre farklılık göstermektedir [9], [10]. Kemiğin iki fazı vardır:

Kollajenden oluşan organik faz ve kemiğin %30'u. İnorganik faz hidroksiapatitten (HA) oluşur ve kemiğin0.6gr Mn0'ını oluşturur.

Buna ek olarak inorganik fazın içerisinde Çinko (Zn), Mangan (Mn), Bakır (Cu) ve İyot (I) gibi eser elementler de bulunmaktadır [11],[12].



Şekil 1.2. *Kemiğin yapısı*

Kemikler, iskelet sistemimizi oluşturan ve eklemler, tendonlar ve bağlar için mekanik destek sağlayan doğal bir kompozit malzemedir. Kemikler hayat boyunca yenilenme ve onarımdan geçen dinamik bir dokudur [13],[14].

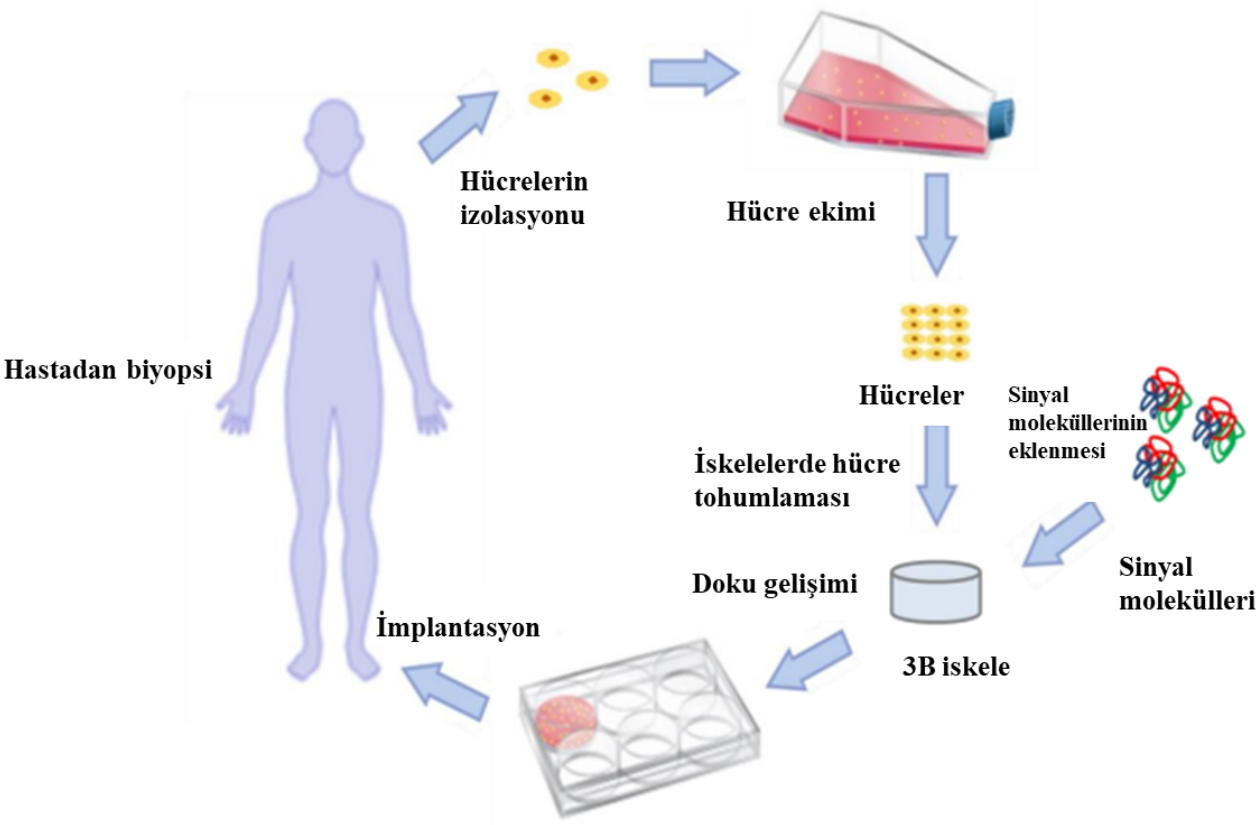
Kemik doku insan vücudundaki bağ dokunu ana kısmını oluşturmaktadır. Kemik doku vücudu dışarıdan gelecek olan tehlikelerden korur, mekanik destek sağlar, hareket etmeye yardımcı olur ve bunlara ek olarak sesin mekanik titreşiminin kulak zarına iletimi küçük kemik parçacıkları tarafından gerçekleştirilmektedir. Kemik dokularından bazılarında kırmızı kemik iliği bulunur ve dolaşım sisteminde önemli bir role sahiplerdir. Kan hücrelerin oluşumu bu kemik dokularda gerçekleşmektedir. Ayrıca kemik dokularında mineral depolanmaktadır ve bu kan kalsiyum seviyelerinin dengelenmesini desteklemektedir [15],[16].

İki tür kemik vardır. Bunlar kortikal kemik ve trabeküler/süngerimsi kemiktir. Kortikal kemiğin yüzey alanı düşük ve yoğundur. Kemik iliğinin boşluğu etrafında bir zarf oluşturmaktadır Trabeküler kemik kortikal kemiğe göre daha az yoğunluğa ve daha geniş yüzey alanına sahiptir. İnsan vücudunun %20'sini süngerimsi kemik, %80'ini kortikal kemik oluşturmaktadır. Kortikal kemik dokusunun mikro mimarisi karmaşıktır ve mekanik ve kırılma özellikleri üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Trabeküler kemik metabolik olarak çok aktif bir role sahip bir dokudur ve uzun kemiklerin, yassı kemiklerin ve omurların merkezini doldurur ve kemik iliği ile doldurulmuş boşluklar veya gözeneklerle ayrılmış birbirine bağlı bir kemik trabeküler ağından oluşur. Bu nedenle, trabeküler kemiğin moleküler bileşimi ve mikro mimarisi, farklı mekanik yükleme ve yeniden şekillenme oranları nedeniyle farklı anatomik konumlar arasında değişebilir. Ek olarak, kemik dokusu inorganik (mineral) ve organik fazların hücre dışı bir matrisini (ECM) içermektedir. Organik faz, toplam matris içeriğinin yaklaşık %25-30'unu oluşturur ve ana bileşen, iki kollajen alfa (I) 1 peptit zincirinden ve bir alfa 2 (I) zincirinden oluşan ve üçlü şekilde birbirine sarılmış bir fibriler protein olan tip I kolajendir. Çoğunluğu HAP'tan oluşan inorganik olan ise geri kalan %70-75'i doldurmaktadır [17], [18],[19],[20].

1.3. Doku Mühendisliği

Kazalar, yaralanmalar gibi çeşitli nedenlerden dolayı doku kayıpları meydana gelmektedir. Doku kaybı günümüzde modern tıp için bir sorundur. İnsan vücudunda hasar görmüş dokular fiziksel boyutu küçük ise kendini yenileyebilmektedir. Fakat fiziksel hasar kritik boyutun üzerinde ise hasarı onarmak için yeni bir dokuya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tarz kendiliğinden iyileşemeyecek olan hasarlar için allogreftler ve otogreftler tercih edilmektedir. Ama bu tedavi yöntemi immün reddi, enfeksiyon, patojenlerin bulaşması, donör doku kıtlığı, donör bölgesi morbiditesi, cerrahi ve donör eksikliği gibi riskler taşımaktadır. Bu riskler düşünüldüğünde daha aza risk ile dokuların yenilenmesine katkı sağlayan doku mühendisliği yaklaşımları umut vericidir [21],[22].

Doku mühendisliği biyomalzemeler (iskeleler), hücreler, biyo-faktörler (büyüme faktörleri gibi) ve mühendislik yöntemlerinin kombinasyonunu kullanarak yaralı dokuları değiştirmek, işlevlerini geri yüklemek ve iyileştirmektedir. Hücre adezyonu, göçü, farklılaşması, proliferasyonu vaskülarizasyonu büyüme faktörleri ile sağlanmaktadır. Doku mühendisliğinde kullanılan prosedürler Şekil 1.3’ te gösterilmiştir [23],[24].



Şekil 1.3. *Doku mühendisliğinde kullanılan prosedürler [25].*

3B ortamda hazırlanan iskeleler hücre dışı matrisinin (ECM) yapısını ve işlevini taklit etmektedir. İdeal bir yapı iskelesi biyolojik olarak parçalanabilir, biyouyumlu, biyoaktif, osteokondüktif ve osteoindüktif olmalıdır [26].

1.4. Kemik Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, mühendislik yaklaşımı ve biyolojik bilimler kullanarak hasarlı bölgeyi yenilemeyi ve onarmayı amaçlar. Doku mühendisliği, dokuları tasarlamak ve üretmek için biyomalzemeleri, büyüme faktörlerini ve hücreleri kullanır.

Uzun bir süredir metaller ve polimerler gibi sentetik malzemeler kullanılmaktadır. Ancak malzemelerin yorulması ve kırılması ile ilgili sorunların üstesinden gelinemez. Bu nedenle, rejeneratif hücrelerin, biyomalzemelerin, büyüme faktörlerinin ve özelleşmiş hücre kültürü ortamlarının kullanımı artmıştır. Ayrıca çoğalma kabiliyeti yüksek, kemik oluşumu için gerekli proteinleri sentezleyen ve immünojenik olmayan hücreler kullanılmalıdır. Genellikle mezenkimal kök hücreler ve osteoblast hücreleri kullanılır.

Osteoindüksiyon ve Osteokundüksiyon yeni kemik oluşumu için önemlidir. Osteoindüksiyon, büyüme faktörleri yardımıyla mezenkimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşması anlamına gelir. Osteokondüksiyon, kemik büyümesinin matris oluşumu tarafından tetiklendiği anlamına gelir [27].

1.4.a. Kemik Doku İskelelerinin Özellikleri

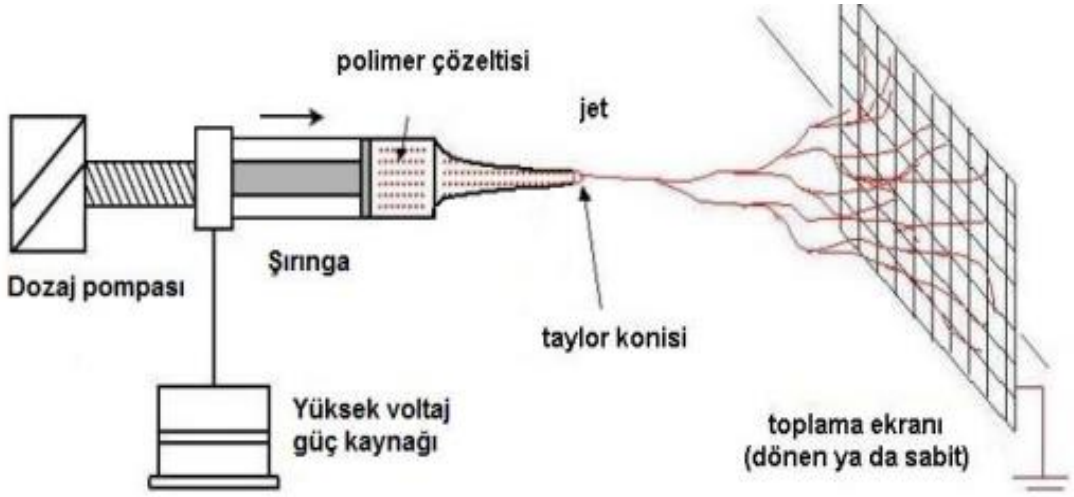
Yapay kemiğin mimarisi önemlidir, çünkü kemiğin mekanik özelliklerini, hücre göçünü, besin tedarikini ve vaskülarizasyonunu etkiler. Birbirine bağlı gözenekli yapı, osteoblast hücrelerinin büyümeleri ve çoğalmaları için göç etmelerine ve besinlere ulaşmalarına izin verir. Gözenek boyutu ayrıca iskele boyunca hücre göçünde çok önemli bir rol oynar. Gözeneklerin boyutu, osteoblast hücrelerinin boyutundan daha büyük olmalıdır, aksi takdirde iskeleye giremezler ve yeni kemik oluşumuna yardımcı olamazlar. Ayrıca iskelenin gözenekliliği mekanik özelliği düşürmemelidir. Vaskülarizasyon ve kemik oluşumu için ideal gözenek boyutunun 300 μm'den büyük olması gerekir. İskelenin yüzey alanı hücre bağlanmasına uygun olmalı ve oksijen, atık ve besin difüzyonunu kolaylaştırmalıdır.

1.5. Yapay Kemik İskelelerinin Üretim Yöntemleri

Yapay kemik iskeleleri üretmenin birkaç yöntemi vardır. Yöntemler aşağıda listelenmiştir.

1.5.a. Elektroeğirme

Bu yöntemde, polimer liflerini toplayıcı üzerinde toplamak için bir elektrik akımı kullanılır. Sistem bir şırınga pompası, metalik toplayıcı, metalik iğne ve güç kaynağından oluşur. Elektrik akımının etkisiyle elektrik yüklü polimerler iğneden lif olarak ayrılır ve toplayıcıya ulaşır. Yüksek yüzeyli gözenekli yapı iskeleleri bu yöntemle üretilir. Şekil 1.4' te elektroeğirme yönteminin sistemi ve kullanılan ekipmanlar gösterilmiştir.



Şekil 1.4. *Elektro-eğirme sistemi [46].*

1.5.b. Dondurarak Kurutma

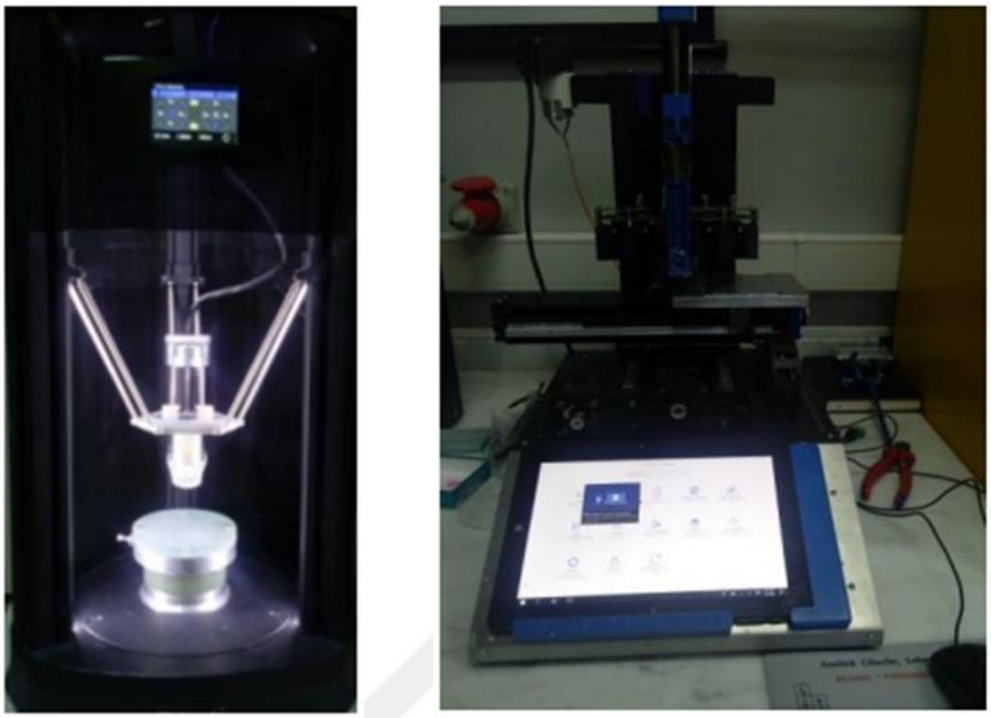
Bu yöntemde iskelenin içindeki polimerik solüsyon kurutulur. Bu süreç üç adımdan oluşmaktadır. İlk adım, çözeltinin hazırlanmasıdır. İkinci adım, iskelenin kalıplanması ve son adım, iskelenin düşük basınç altında dondurulması ve kurutulmasıdır. Son adımda, buz ve su süblimasyon ve desorpsiyon yoluyla geri alınır. Bu yöntem, 20 ila 200 μm gözenek boyutu aralığında, %90 gözenekliliğe sahip yapı iskelelerinin üretilmesini sağlar. Sıcaklık, donma hızı ve polimer konsantrasyonu gözenek boyutunu etkiler. Birbirine bağlı ve yüksek gözenekli bir iskele oluşturmak için yüksek mukavemetli vakum gereklidir [28].

1.5.c. Gaz Köpürtme

Bu yöntemde gözenekli bir yapı elde etmek için karbondioksit gazı yerine organik çözücüler kullanılmaz. Böylece organik çözücülerin toksik etkisi önlenmiş olur [29]. Bu yöntemin avantajı, hem hidrofilik hem de hidrofobik polimerlerin kullanılabilmesi ve ayrıca HA gibi inorganik dolgu dispersiyonlarının bir polimer matriks içinde kompozit elde edilebilmesidir. Ancak gözeneklerin büyüklüğünü ve birbirine bağlı yapısını kontrol etmek zordur [30].

1.5.d. 3B Biyobaskı

Bu yöntem Eklemeli İmalat olarak da bilinir. Biyobaskı, canlı hücreler, hücre dışı matris (ECM) ve biyomalzemeler kullanılarak "aşağıdan yukarıya" karmaşık yapay kemik yapı iskeleleri üretmek için kullanılabilir. Bu yöntem, iskele içinde kan damarlarının oluşumu için dahili vaskülarize yapıların üretilmesini sağlar. Bu teknik ile gözenek boyutu ayarlanabilmekte, ayrıca homojen gözenek boyutu dağılımı sağlanmaktadır. Bilgisayarlı Tomografi (CT) taramaları ve Bilgisayar destekli tasarım (CAD) programları kullanılarak kişiye özel kemik iskeleleri üretilebilir. Çeşitli 3B biyobaskı teknikleri vardır: Seçici Lazer Sinterleme, Ekstrüzyon tabanlı 3B Baskı, Mürekkep Püskürtmeli Biyobaskı, Erimiş Biriktirme Modelleme ve Lazer Destekli 3B Biyobaskı [31]. Şekil 1.5’ te doku mühendisliğinde kullanılan bazı 3B yazılar görülmektedir,



Şekil 1.5. *Doku mühendisliğine kullanılan 3B yazıcılar*

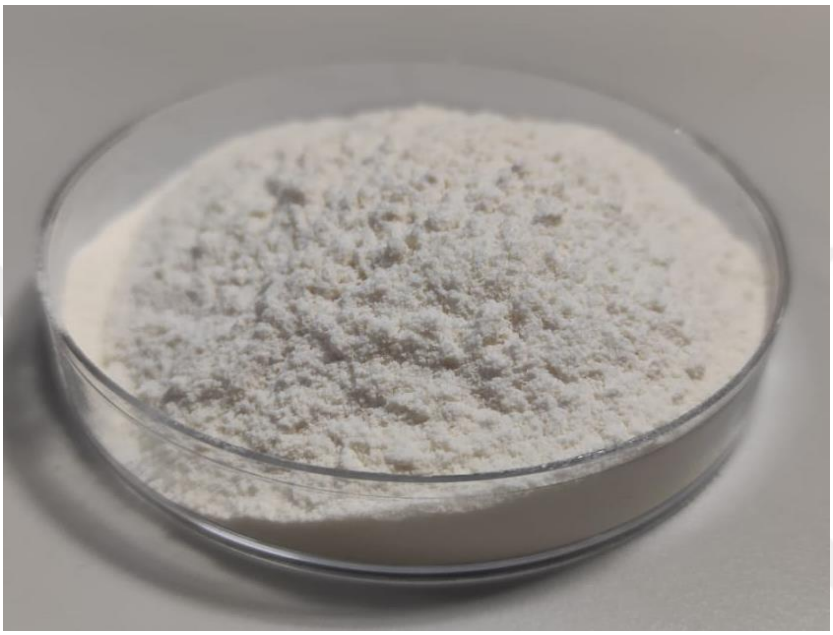
1.6. Kemik Dokuda Kullanılan Malzemeler

İskele tasarımının çoklu gereksinimleri nedeniyle kemik doku mühendisliğinde kompozit malzemeler kullanılmaya başlanmıştır böylece iki veya daha fazla malzemenin avantajlarından faydalanılmıştır. En önemli kompozit türlerinden biri olan organik-inorganik kompozit türünde polimer bileşen malzemenin sünekliğini ve inorganik bileşen ise malzemenin sertliği ve dayanımını sağlamaktadır [32]. Polimer malzemesi olarak sodyum aljinat (SA),polycaprolactone (PCL), jelatin, kitin, kolajen, selüloz, nişasta, ipek gibi doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. İnorganik malzeme olarak ise Hidroksiapatit (HA), biyoaktif cam, alümina ve kalsiyum fosfat kompozit malzemenin biyoaktivitesini ve mekanik özelliklerini arttırdıklarından dolayı yaygın olarak kullanılan biyoseramiklerdir [33].

1.6.a. Sodyum Aljinat

Sodyum Aljinat (SA), kapsülleme, yara pansumanı, kemik dokusu mühendisliği ve immobilizasyon gibi çeşitli biyomateryal uygulamalarında kullanılan polisakkarit bazlı,

suda çözünür, doğal bir polimerdir. Şekil 1.6'da görüldüğü gibi toz halde kullanılmaktadır. Mekanik özellikleri zayıf olduğundan, uygulama alanına göre mekanik dayanımını arttırmak amacıyla bazı kimyasallarla çapraz bağlanır. Ayrıca çapraz bağlı olmasına rağmen kök hücrelere iyi matriks özellikleri sağlar, kök hücreler çapraz bağlı SA yapı iskeleleri içerisinde canlılıklarını koruyabilirler [34].



Şekil 1.6. *Sodyum aljinat*

SA'nın mekanik özellikleri ve biyolojik bozunma davranışı onun sert doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasına izin vermemektedir. Bu nedenle kompozit malzeme yapımında seramiklerle birlikte kullanılır [35].

SA hücreler için bir matris görevi görürken seramik dolgu maddesi görevi görür. Seramiğin biyolojik bozunma hızı gerçekten yavaş olduğundan her iki malzemenin avantajlarından yararlanılır.

SA iki alt birimden oluşur. M kalıntısı d-mannuronik asittir, G kalıntısı ise glukuronik asittir. G ve M kalıntılarının sayısı SA'nın kaynağına bağlıdır. Önceki çalışmalar SA'nın kemik doku mühendisliğinde hyaluronik asitten daha avantajlı olduğunu göstermiştir.

Kalsiyum iyonlarının varlığı jelleşmeyi tetikler. Kalsiyum iyonları hem doğal kemikte hem de HA biyoseramikte bol miktarda bulunduğundan SA'nın jelleşmesi kaçınılmaz hale gelir [34],[35],[36],[37].

1.6.b. Hidroksiapatit

HA ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), biyoaktivitesi, osteokondüktivitesi, biyouyumluluğu ve doğal kemikle yapısal benzerliği nedeniyle en yaygın kullanılan biyoseramiktir. Şekil 1.7'de görüldüğü gibi toz hale getirilerek kullanılmaktadır. HA, osteoblast çoğalmasına ve mezenkimal kök hücrelerin (MSC) farklılaşmasına yol açan kalsiyum iyonlarının sayısını artırır. Ayrıca implante edildiğinde immünojenik reaksiyona neden olmaz [38].



Şekil 1.7. *Hidroksiapatit*

HA, yukarıda sayılan üstün özelliklerinden dolayı son yıllarda yapay kemik iskelelerinin üretiminde bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. Ancak bazı dezavantajları da var. Kırılgan yapısı BTE uygulamalarına uygun değildir. Tablo 1.1'de hidroksiapatitin mekanik özelliklerinde bu durumu açıklamaktadır.

Tablo 1.1. *Hidroksiapatitin Mekanik Özellikleri [52].*

Basınç Dayanımı	400 MPa
Gerilme Direnci	≈ 40 MPa
Elastik Modülü	≈ 100 GPa
Kırılma Tokluğu	≈ 1.0 MPa $\sqrt{\ }$m

HA'nın gözenekli yapısı HA bazlı kemik iskelelerinin doğal kemiğe bağlanmasını sağlar. İdeal kemik iskeleleri, hücrelerin iskele boyunca nüfuz etmesine, büyümesine ve farklılaşmasına izin verir. Gözenekli yapı vaskülarizasyon ve hücre canlılığında önemli bir rol oynar. Ek olarak hücreler gözenekli yüzeylere kolaylıkla yapışır [39].

1.7. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Elementler

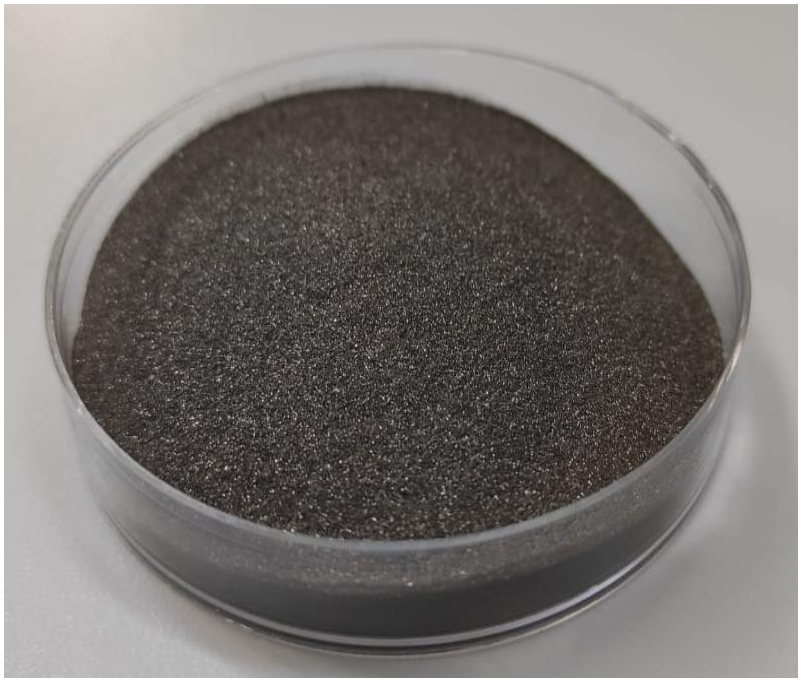
Kemik doku mühendisliğinde kullanılan seramiklerin geç bozulması, düşük mukavemet gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunların üstesinden gelebilmek için insan vücudundaki eser elementler (Sr, Mg, Zn, Mn, Cu, Fe, Se gibi) ile birleştirilerek kemik doku iskeleleri üretilmektedir [40]. Osteogenezi tetiklemesi için terapötik etkisi olan metal iyonları seramiklerle birlikte kullanılmaktadır. Fakat bazı metal iyonları toksik etki gösterebilmektedir. Örneğin Mangan (Mn), Bakır (Cu) ve Çinko (Zn) kullanılarak yapılan karşılaştırılmalı bir çalışmada Mn içerikli kemik iskelelerinin yapılan hücre testleri sonucunda toksik etkisinin Cu ve Zn ile karşılaştırıldığında daha az, hücre canlılığının ise daha fazla olduğu görülmüştür [41]. Yapılan başka bir çalışmada ise Selenyum (Se) ve Mn iyonlarının etkisi karşılaştırılmıştır. Hücre testleri sonucunda Mn içeren kemik doku iskelelerinin MG63 hücreleri için sito-uyumlu ve metabolik olarak aktif olduğu gözlemlenirken Se içeren kemik doku iskelelerinin hücre canlılığını azalttığı ve MG63

hücrelerini apoptozuna sebep olduğu gözlemlenmiştir [42]. Bu nedenlerden dolayı tez çalışmasında Mn elementi kullanılmıştır.

1.7.a. Mangan

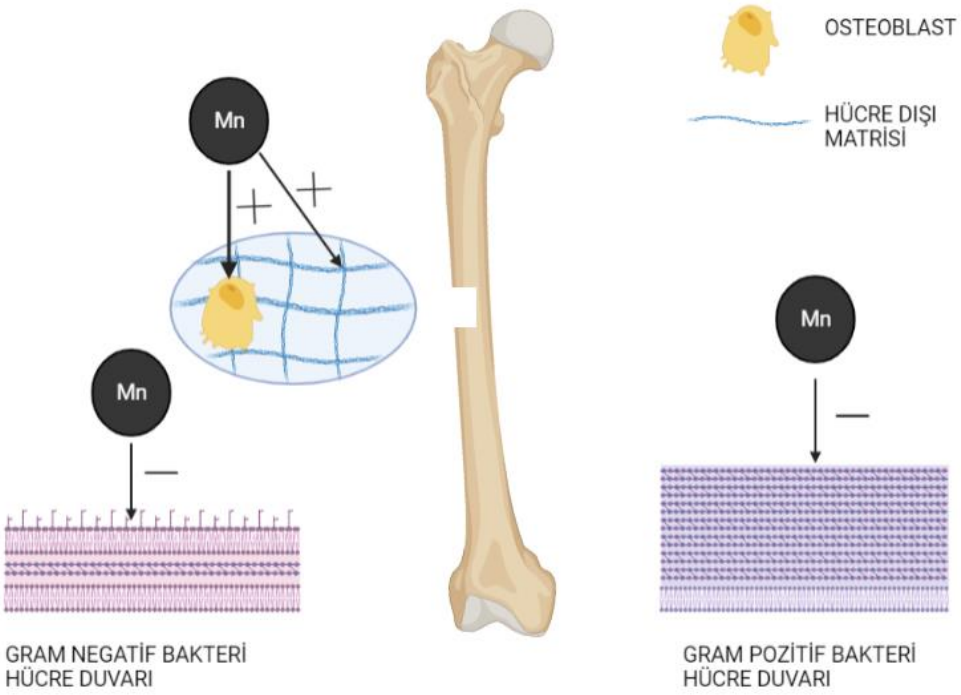
Mn kemikte bulunan en belirgin eser elementlerden biridir ve yaklaşık 1.7-3 ppm kemik içeriğinde bulunmaktadır. Şekil 1.8' de görüldüğü gibi kemik doku mühendisliğinde toz halde kullanılmaktadır, Mn kemiklerin ve kasların metabolizmasını düzenlemede önemli bir göreve sahiptir. Ayrıca Mn eksikliği osteoblast aktivitelerini zayıflatarak osteogenezin gecikmesine neden olur ve bu da kemik deformasyonu, büyüme inhibisyonu, azalan hareket koordinasyonu ve hatta kemik erimesiyle sonuçlanır.

Mn elementi mukopolisakkaritlerin karbonhidrat sentezi metabolizmasında kısmen görev alarak kemiğin büyümesine ve gelişmesine katkıda bulunur [43]. Hücre adezyonunda görevli olan moleküllerden integrinler gibi hücrelerin birbirlerine yapışmasını sağlamaktadır. Mn kemiklere kalsiyum bağlayan protein osteokalsinin stimülasyonunu arttırmaktadır ayrıca alkalin fosfataz aktivitesini artırarak kollajen tip I üretimini geliştirir ve kemiğin hücre dışı matrisinin yeniden şekillenmesini sağlar.



Şekil 1.8. *Toz halde mangan elementi*

Daha önce yapılan çalışmalarda HA-Mn bir arada kullanıldığında kemik rejenerasyonu hızının arttığı gözlemlenmiş ve yapılan biyouyumluluk testi sonuçlarına göre düşük seviyede Mn eklenmiş olan yapılarda kemik mineralizasyonunda önemli artış ile osteoblast proliferasyonunu ve canlılığını iyileştirdiği görülmüştür.



Şekil 1.9. *Mn elementinin kemik hasarının iyileşmesine etkisi*

Şekil 1.9'da görüldüğü gibi Mn elementi kemik hasarını iyileştirmede oldukça etkilidir. Bunlara ek olarak Mn katkılı yapılarda termal ve mekanik kararlılığın arttığı saptanmıştır [44]. Mn'nın bu özelliklerinin yanı sıra düşük konsantrasyonlarda hücreler için toksik etki yaratmadan antibakteriyel etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu özellik sayesinde osteomyelit (kemik iltihabı) hastalığın neden olan bakterilerin inhibisyonunu sağlamaktadır [45].

Bu çalışmada SA, HA ve Mn kullanılarak elde edilecek olan seramik kompozit biyomürekkepler 3B yazıcıda üretilerek kemik doku iskelesi elde edilmiştir. Biyomürekkep olarak adlandırılmasındaki en temel neden üretilecek olan kemik iskelelerinin canlı için toksik bir etki oluşturmamasının yani biyoyumlu olmasının

istenmesidir ve ayrıca ticari olarak bu tür malzemeler biyomürekkep olarak adlandırılmaktadır [35],[36]. Bu çalışmada SA, HA ve Mn kullanılarak hazırlanmış biyomürekkep 3B yazıcı teknolojisiyle kemik doku iskelesi üretiminde kullanılmıştır. Bilindiği üzere HA doğal kemiğe benzerliğinden dolayı birçok kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Fakat HA'nin özellikleri saf halde kullanılması istenilen özelliklerde kemik dokusu üretilmesine izin vermemektedir. Bundan dolayı HA'ler bu çalışmada SA polimeri kombine edilerek birlikte kullanılmıştır. SA doğal bir polimerdir ve iskele üretmek için hazırlanan karışımın 3B yazıcı ile kemik iskelesine dönüştürülmesinde kıvamı uygun hale getirmektedir. Daha önceki çalışmalar incelendiğinde Mn elementinin 3B yazıcı ile kemik doku iskelesi üretiminde kullanılmadığı görülmüştür. Ayrıca, oluşabilecek bakteriyel enfeksiyonlara karşı antibakteriyel etki sağlayabilme potansiyeli mevcuttur.

Tez çalışması aşağıdaki unsurlar nedeniyle özgündür:

1- Literatürde ilk kez kemik hasarı için SA/HA/Mn kombinasyonundan oluşan bir seramik kompozit biyomürekkep geliştirilecek ve doku iskelesi üretilmiştir.

2- Tasarlanan proje ile Mn içeren SA/HA doku iskeleleri ile kemik doku mühendisliğine yeni bir yaklaşım getirilmiştir.

3- 3B baskı tekniği kullanılarak istenilen boyutlarda tasarlanmış olan doku iskelesi üretilebilecek ve üretilen kemik iskeleleri hücre büyümesi için gerekli olan gözenek boyutuna sahip olmuştur.

4-SA/HA/Mn kombinasyonu ilk kez 3B baskı tekniği kullanılarak kemik doku mühendisliğinde kullanılmıştır.

5-Mangan elementinin antibakteriyel özelliği kullanılmıştır.

2.MATERYAL ve YÖNTEM

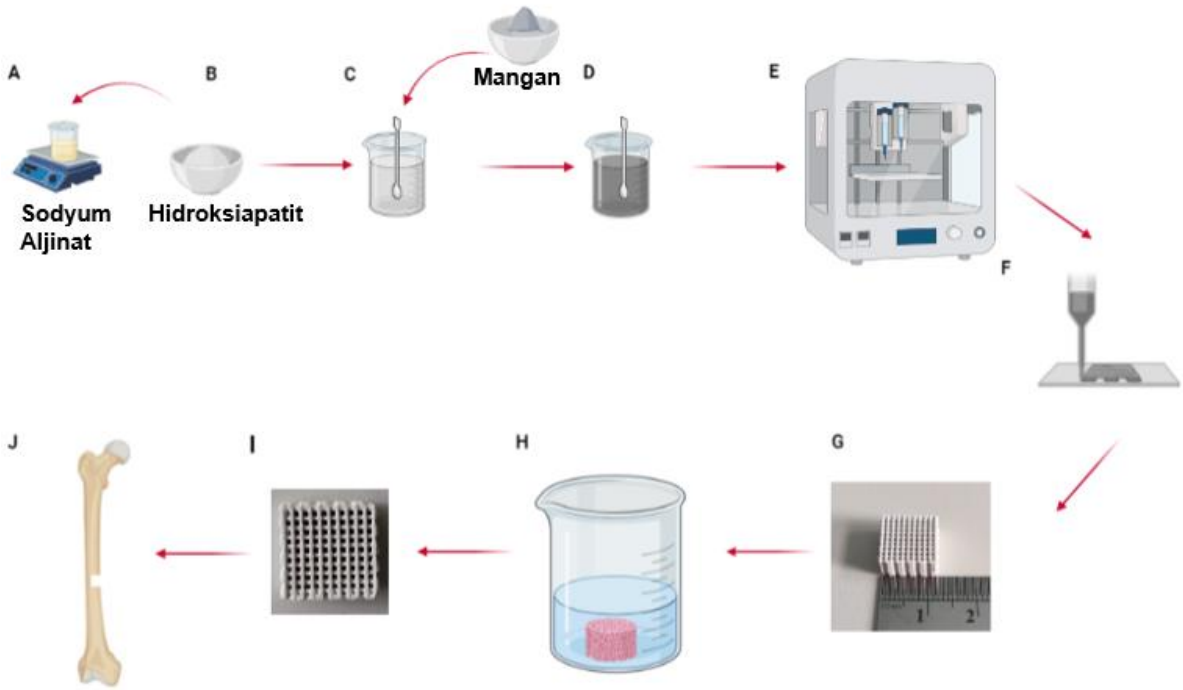
2.1. Materyal

Hidroksiapatit: Hidroksiapatit (HA, MW = 502,31 g/mol) Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır.

Mangan: Nanokar firmasından satın alnmıştır. %99 metal tozdur.

Sodyum Aljinat: SA (216,121 g/mol molekül ağırlığı) Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır.

2.2. Yöntem



Şekil 2.1. *Deneyde kullanılan metodlar A) Sodyum aljinat solüsyonunun hazırlanması B) Hazırlanan solüsyona HA'nın eklenmesi C) Mn elementinin hazırlanan HA-SA solüsyonuna eklenmesi D) Solüsyonun homojen bir şekilde karıştırılması E) 3B yazıcının kurulumu F) Hazırlanan biyomürekkebin basımı G) Basılan iskelenin görüntüsü H) Basılan iskelenin $CaCl_2$ solüsyonu ile çapraz bağlanması I) Kemik iskelesinin son görüntüsü J) Üretilen kemik doku iskelesinin hasarlı kemik dokuya uygulanması*

2.2.1. Kemik Yapısını Oluşturacak olan Seramik Kompozit Biyomürekkebin Hazırlanması

Öncelikle %110 HA içeren HA-SA oranının 10/0.77 olduğu seramik kompozit biyomürekkep için kullanılacak olan malzemelerin hesaplaması yapılmıştır. 0.84 gr SA ve 11 gr HA'nın tartımı gerçekleştirilmiştir. 10 ml saf su ve 0.84 gr SA behere aktarılmıştır. İçerisine balık eklenerek yaklaşık 10 dk karıştırıcıda ısı verilmeden sadece dönmesi sağlanmıştır. Ardından 11 gr HA eklenerek bir kaşık yardımı ile homojen bir kıvam elde edilene kadar karıştırılmıştır. Deneyde ***Tablo 2.1'***de görüldüğü gibi 4 farklı seramik kompozit biyomürekkep üretilmiştir. Bunlar kontrol grubu, 0.2, 0.6 ve 1 gr Mn şeklindedir. Mn içeren çözeltilerde HA eklenmesinden sonra belirlenen oranda Mn eklenerek kaşık yardımı ile homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır [32].

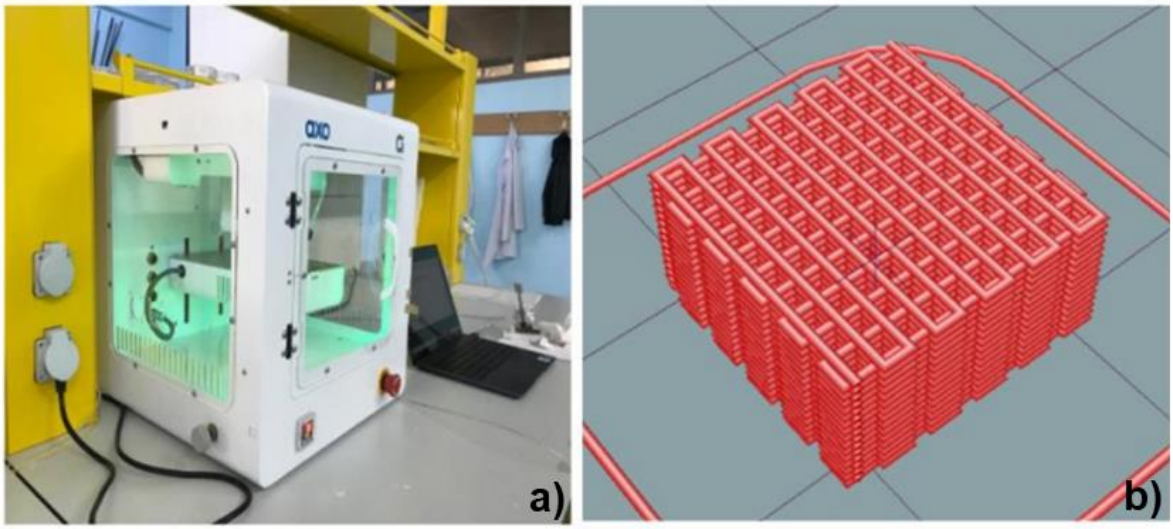
Tablo 2.1. *Formüle edilen seramik kompozit biyomürekkebin konsantrasyonları*

	Sodyum Aljinat (SA) W_{SA}/V_{dH20}+SA+HA+Mn	Hidroksiapatit (HA) W_{HA}/V_{dH20}+SA+HA+Mn	Mangan (Mn) W_{Mn}/V_{dH20}+SA+HA+Mn
SA/HA (10/0.77)	0.84	11	0
SA/HA (10/0.77) +0.2 gr Mn	0.84	11	0.2
SA/HA (10/0.77) +0.6 gr Mn	0.84	11	0.6
SA/HA (10/0.77) +1 gr Mn	0.84	11	10

2.2.2. Hazırlanan Seramik Kompozit Biyomürekkebin Reolojik Özelliklerinin Analiz Edilmesi

Seramik kompozit biyomürekkebin viskozitesi, yoğunluğu ve yüzey gerilimi ölçülmüştür. Seramik kompozit biyomürekkebin viskozitesi, ortam sıcaklığında bir dijital viskozimetre (DV-E, Brookfield AMETEK, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Solüsyonların yoğunluğu, standart 10 mL'lik bir yoğunluk şişesi olan DIN ISO 3507-Gay-Lussac (Boru Cam Inc., Türkiye Cumhuriyeti) kullanılarak analiz edilmiştir. Solüsyonların yüzey gerilimi ise, bir Sigma 703D, Attention, tensiometer (Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Her test on kez tekrarlanmıştır. Deneylerden önce tüm ekipmanlar kalibre edilmiştir [28].

2.2.3. Üç Boyutlu Kemik Doku İskelelerinin Basımının Tasarımının Yapılması ve STL Formatına Dönüştürülmesi



Şekil 2.2. *a) İskelelerin basıldığı 3B yazıcı b) İstenilen boyutlarda tasarlanmış olan şeklin STL formatına dönüştürülerek 3B yazıcının programındaki görüntüsü*

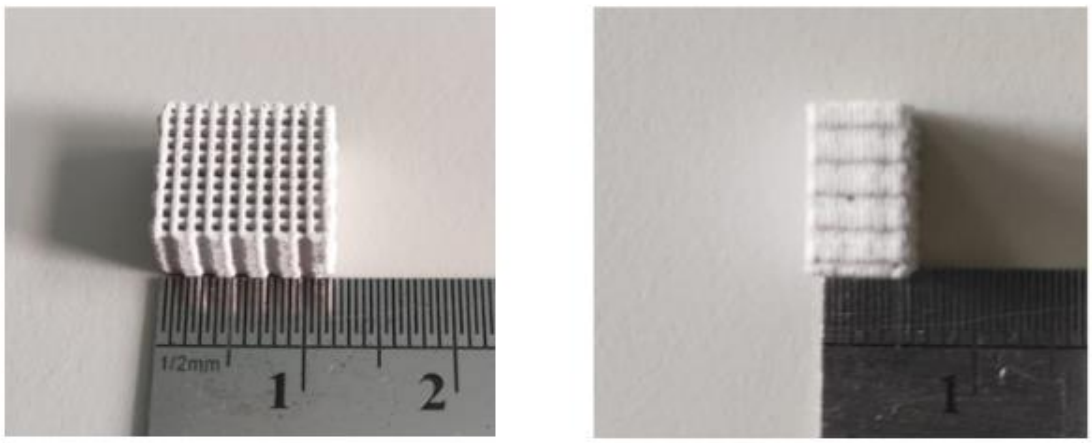
İlk olarak üretilmek istenilen kemik iskelesinin 1.2 cm x 1.2 cm x 0.6 cm yatay, dikey ve yükseklik boyutlarına sahip 30 katlı bir yapı Tinkercad programı kullanılarak tasarımı elde edilmiştir. 3B yazıcıya yüklenmesi için STL formatına dönüştürülmüştür. ***Şekil 2.2'de*** görüldüğü gibi yazıcı ayarlarından % 40 doluluk oranı seçilmiştir. İğne çapı, yazma hızı, akış miktarı (debi), basınç değeri gibi parametreler ön çalışmada kullanılan değerler referans alınarak düzenlenmiştir. Tablo 2.2'de bu değerler görülmektedir.

Tablo 2.2. *3B baskı sırasında iskelelerin işlem parametreleri*

Parametreler	Değerler
Katman Sayısı	30
İğne Ucu	22G
Oda Sıcaklığı (^{o}C)	25
Yazdırma Yüzey Sıcaklığı (^{o}C)	25
Dolgu Yoğunluğu (%)	40
Dolgu Hızı (mm/sn)	3-4

2.2.4. Üç Boyutlu Yazıcı İle Üç Boyutlu Kemik Doku İskelelerinin Oluşturulması

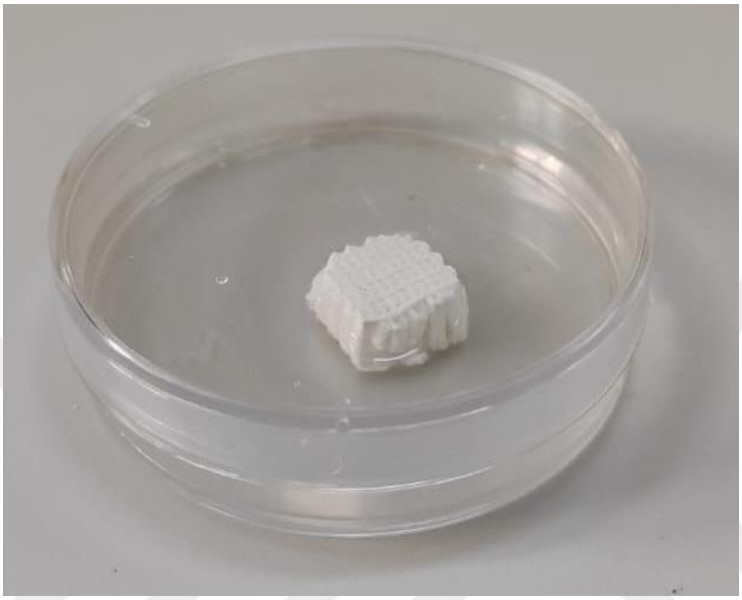
Öncelikle basım yapılacak olan 3B yazıcı kurulup ve ayarlamalar yapılmaya başlanmıştır. İlk olarak kemik solüsyonu şırıngaya dökülmüş ve kullanılacak olan iğne ucu takılmış ve dolu şırınga, 3B yazıcının iğne yuvasına yerleştirilmiş ve vida yardımı ile yuvaya sabitlenmiştir. Bu aşamadan sonra basım yapılacak yüzey ile şırınga ucu arasındaki mesafe ayarı yapılmıştır. İlk aşamada Tinkercad programında çizilen iskele tasarımı 3B yazıcının programına yüklenmiş ve optimum hız ile doluluk oranı ayarlanmıştır. Son olarak hava kompresörü çalıştırılmış ve basınç optimum düzeye getirildikten sonra basım başlatılmıştır. Şekil 2.3'te basılmış bir örnek yer almaktadır.



Şekil 2.3. *3B yazıcıda basılmış kemik iskelelerinin görüntüsü*

2.2.5. Üretilen İskelelerin Çapraz Bağlama İşlemi

Üretilen iskelelerin çapraz bağlanması $CaCl_2$ solüsyonunda bekletilerek sağlandı.1 gr Mn'luk $CaCl_2$ solüsyonu hazırlandı. 1 gr $CaCl_2$ tartıldı ve 10 ml saf su içerisine eklenerek karışması sağlandı. Basımı yapılan ve kuruyan iskeleler hazırlanan solüsyonda 2 saat kadar bekletildi ve kurutuldu. Böylelikle çapraz bağlanma işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 2.4. *Basılan kemik iskelelerine çapraz bağlanma işlemi*

2.2.6. Üretilen Kemik Doku İskelelerinin Karakterizasyonunun Yapılması

2.2.6.a. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

3D baskılı HA-SA bazlı Mn yüklü kemik iskelelerinin 3D morfolojik özellikleri, yüzeyi, gözenek boyutları ve mikro yapısı SEM ile analiz edildi. Bu test için SEM, EVO LS 10, ZEISS cihazı kullanıldı. Elde edilen SEM analizi iskelelerin gözenek boyutunu ölçmek için kullanıldı. Her bir iskeleden 53 gözenek boyutu ölçüldü (0.2, 0.6, 1 gr Mn), daha sonra elde edilen veriler SPSS yazılımına aktarılarak histogram grafikleri ve gözenek boyutu dağılımı çizildi. Gözenek boyutu analizi için görüntüler 10 kV ve 50X büyütme altında çekildi.



Şekil 2.5. *Taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazı*

2.2.6.b. Fourier Dönüşümü-Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analizi

FTIR, fourier matematiksel dönüşümüyle ışığın kızılötesi yoğunluğunu dalga sayısına karşı ölçen kimyasal bir analitik yöntemdir. IR ışınları madde içinden geçerken molekül veya atom bağlarının bükülmesi, gerilmesi, titreşimi veya dönmesi sonucu soğurularak spektrum oluşmasıdır. FTIR analizleri Jasco FT/IR-4700 cihazı kullanılarak yapılmaktadır. İskelelerin fonksiyonel gruplarını belirlemek ve kemik yapılarını incelemek amacıyla kullanılmıştır. Tüm spektrumlar 4000 400 cm^{-1} tarama aralığı ve 32 taramanın toplamı arasında alınmıştır.



Şekil 2.6. *FTIR cihazı*

2.2.6.c. X-Işını Kırınımı (XRD)

XRD analizi için Shimadzu marka, 6100 model (Japonya) cihaz kullanılmıştır. Numunelerin XRD desenleri, bir Cu kaynağı (λ = 1.54060 A°) kullanılarak analiz edilmiştir. Örnekler sırasıyla 40 kV ve 30 mA çalışma voltajı ve akımında taranmış ve arama aralığı 10–90 °, tarama hızı 0.48 (°/dak) ve ön ayar süresi 2 saniyeye ayarlanmıştır.



Şeki 2.7. *XRD cihazı*

2.2.6.d. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

İskelelerin termal özellikleri DSC (Shimadzu DSC-60 Plus) analiz yöntemi kullanılarak belirlendi. İskeleler 25–400 °C sıcaklık aralığında ve 10 °C/dk tarama hızında test edilmiştir.



Şekil 2.8. *Diferansiyel taramalı kalorimetri Shimadzu DSC60 Plus cihazı*

2.2.6.e. Mekanik Analiz

3D baskılı HA-SA bazlı Mn yüklü kemik iskelelerinin basınca karşı mekanik direncini ölçmek için sıkıştırma testi uygulandı. İskelelerin gerilme-gerinim eğrisi Shimadzu basma test cihazı kullanılarak elde edildi. Plakaların arasına iskeleler yerleştirildi ve ardından basınç testine başlandı. Test oda sıcaklığında, 490 N'da ve 1 mm/dak test hızında yapılmıştır.



Şekil 2.9. *Shimadzu Basma Testi Cihazı*

2.2.6.f. Antimikrobiyal Aktivite Testi

İncelenecek olan örnekler 5 ml Luria-Bertani sıvı besiyeri içerisine eklenip bakteri kültürü 24 saat boyunca 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonrasında seri dilüe edilmiş ve sonrasında Tryptic Soy Agar besiyerine yayma ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyon sonrasında koloni sayımı yapılmıştır. % inhibisyon oranı içerisinde örnek içermeyen bakteri kontrolü ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Bakteri olarak gram negatif (*Escherichia coli*) bakteriler üzerinde test edilmiştir. Bu bakteriler, implantasyon ve cerrahi tedaviler sırasında çoklu enfeksiyonlara neden olmaya yatkın oldukları için seçilmiştir.

2.2.6.g. Hücre Kültürü Testleri

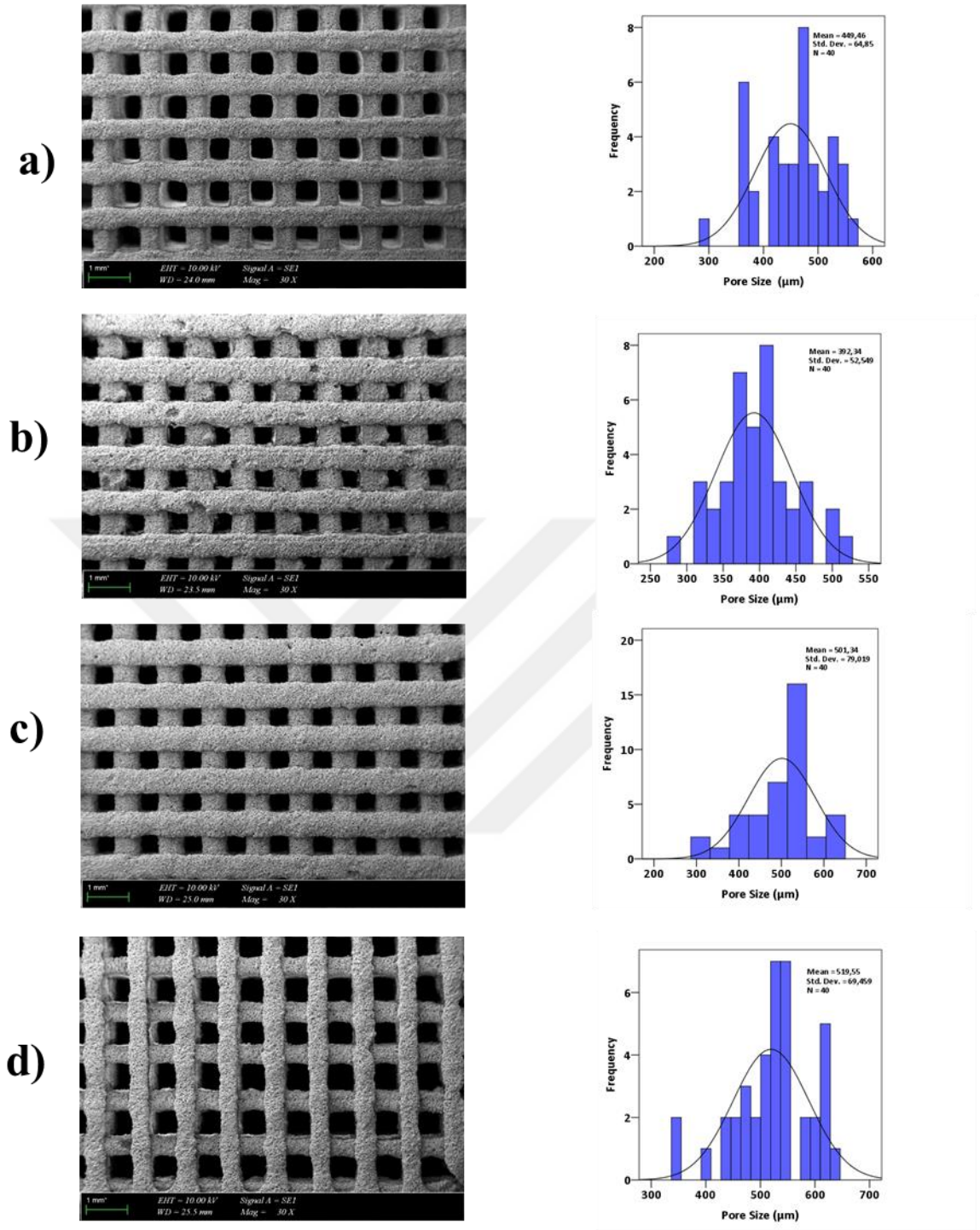
DMEM/F-12 (Dulbecco'nun Modifiye Kartal Ortamı/ Besin Karışımı F-12), FBS (Fetal Bovin Serum), L glutamin, penisilin/streptomisin, BSA (Bovine Serum Albumin) ve fosfat tamponlu salin (PBS) tabletleri Amresco'dan satın alınmıştır (Solon, ABD). (%99 saflık, hacim/hacim), 3-(4,5-dimetil-2-tiyazol)-2,5 difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) tozu, %0.25' te Tripsin/EDTA solüsyonu (ağırlık/hacim), glutaraldehit, dimetilsülfoksit (DMSO), heksametildisilan (HMDS) (%99 saflık, hacim/hacim), BCIP/NBT tabletleri Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, ABD) elde edilmiştir. Ayrıca boyama kitleri Alizarin Red-S ve Alkali Fosfatlar (ALP) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, A.B.D.) satın alınmıştır.

Kontrol grubu, 0.2 gr Mn , 0.6gr Mn ve 1gr Mn- HA' ların biyolojik karakterizasyonları MC3T3-E1 fare osteoblast hattı ile yapılmıştır. Bu deneyde toz ve iskele olmak üzere iki farklı HA morfolojisi kullanılmıştır. Başlangıç olarak iki grup UV altında 45 dakika sterilize edilmiştir. Toz numuneler 96 kuyucuklu plakalara yerleştirilirken iskeleler 24 kuyucuklu olanlara yerleştirilmiştir. Tüm plakalara $3x10^3$ hücre/mL konsantrasyonunda MC3T3-E1 hücresi ekilmiştir. Örnekler 21 gün boyunca (37^oC, %5 CO_2) inkübe edilmiş ve büyüme ortamı DMEM/F-12, FBS (%10 hacim/hacim), penisilin streptomisin çözeltisi (%1 hacim/hacim), L-glutamin (%1 hacim/hacim) kullanılarak hazırlanmıştır.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

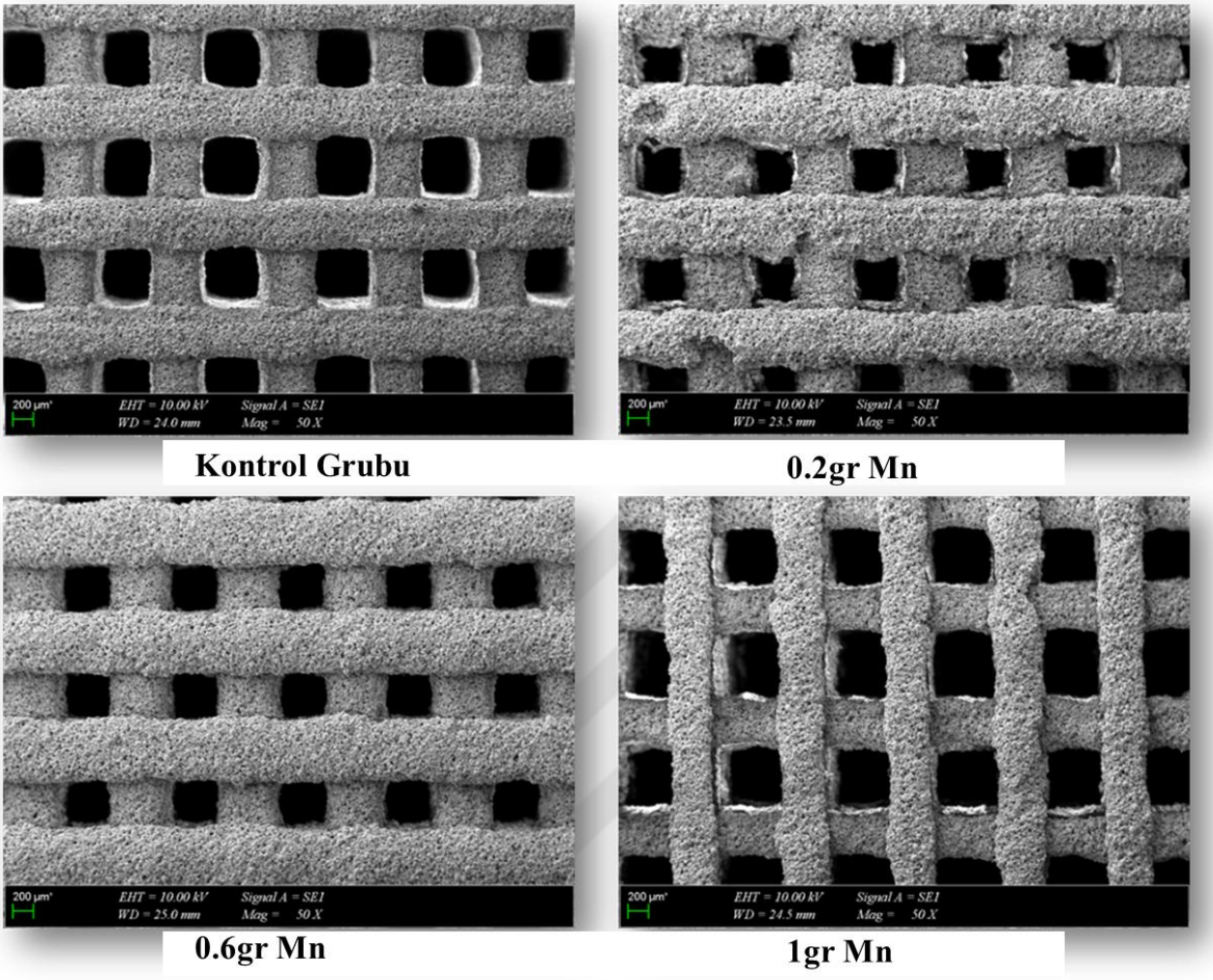
3.1. Morfolojik Yapı Analizi

Çapraz bağlı iskelelerin SEM görüntüleri Şekil 3.1’ de gösterilmektedir. HA/SA iskelesinin gözenek boyutu 370-470 μm arasında değişmektedir. HA/SA/0.2gr Mn iskelesinin gözenek boyutu 370-420 μm arasında değişmektedir. HA/SA/6 Mn' nin gözenek boyutu 480-550 μm arasında değişmektedir. HA/SA/1gr Mn iskelesinin gözenek boyutu 510-560 μm arasında değişmektedir. SEM analizi sonucunda porların giderek artmasının en büyük nedeni Mn ilavesi ile hazırlanan solüsyonun viskozitesinin artmasıdır. Çünkü viskozite arttıkça 3B yazıcı ile basımda katmanların yayılmasının engellenmesidir. Katmanlar yayılmadığı için porlar daha açık ve büyüktür. Yüksek viskozitenin 3 boyutlu biyobaskıda düzensiz iskele yapısına ve basılabilirlik sorunlarına neden olduğu görülmüştür [49]. Bu çalışmada vizkozitenin artması herhangi bir soruna yol açmamıştır.



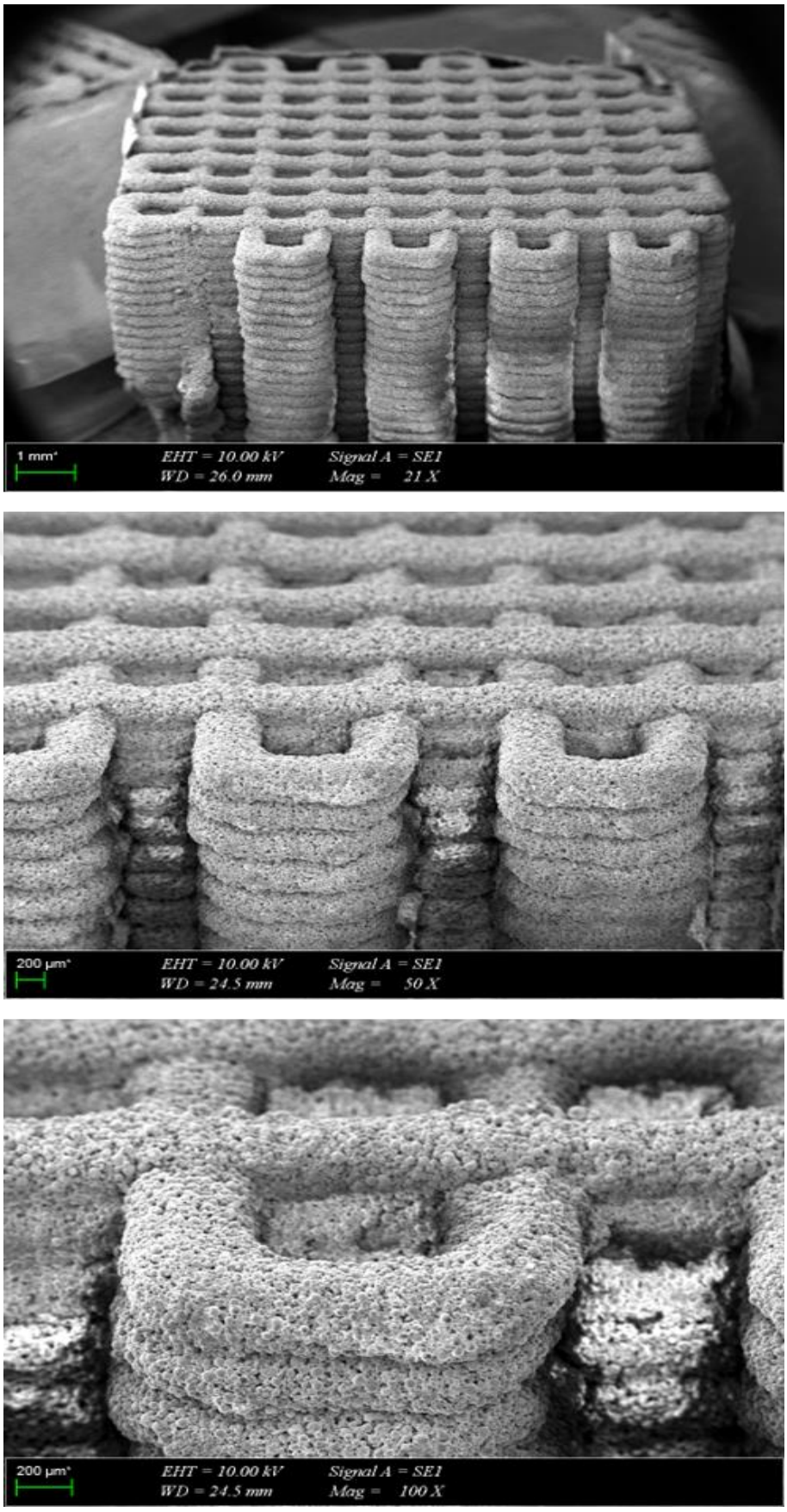
Şekil 3.1. *SEM görüntüleri a) Kontrol Grubu b)0.2gr Mn c)0.6gr Mn d)1gr Mn*

Şekil 3.2'de SA/HA, SA/HA/0.2gr Mn Mn, SA/HA/ 0.6gr Mn ve SA/HA/ 1gr Mn doku iskelelerine ait SEM görüntüleri yer almaktadır. Por boyutlarının homojen bir şekilde dağıldığı ve porların kare şekilde olduğunu söylemek mümkündür. Çapraz bağlama yapılmış olduğundan basılan doku iskelelerinin yayılmadan düzenli bir görüntüye sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 3.2. *SEM görüntüleri*

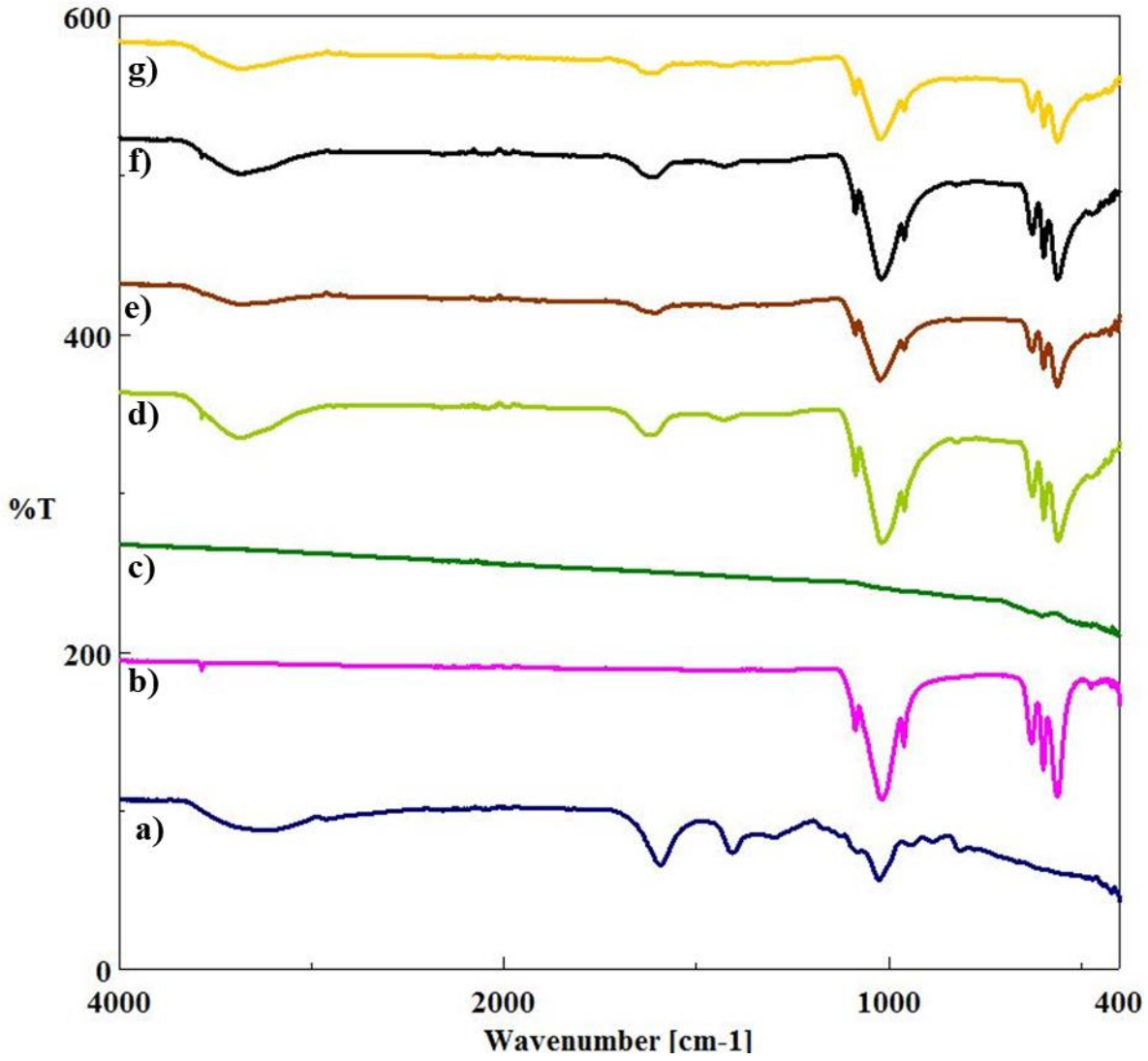
Şekil 3.3'de katmanların düzenli bir yapıda olduğu görülmektedir.



Şekil 3.3. *Basılan iskelelerin katmanlı yapısını gösteren SEM görüntüleri*

3.2. Kimyasal Yapı Analizi

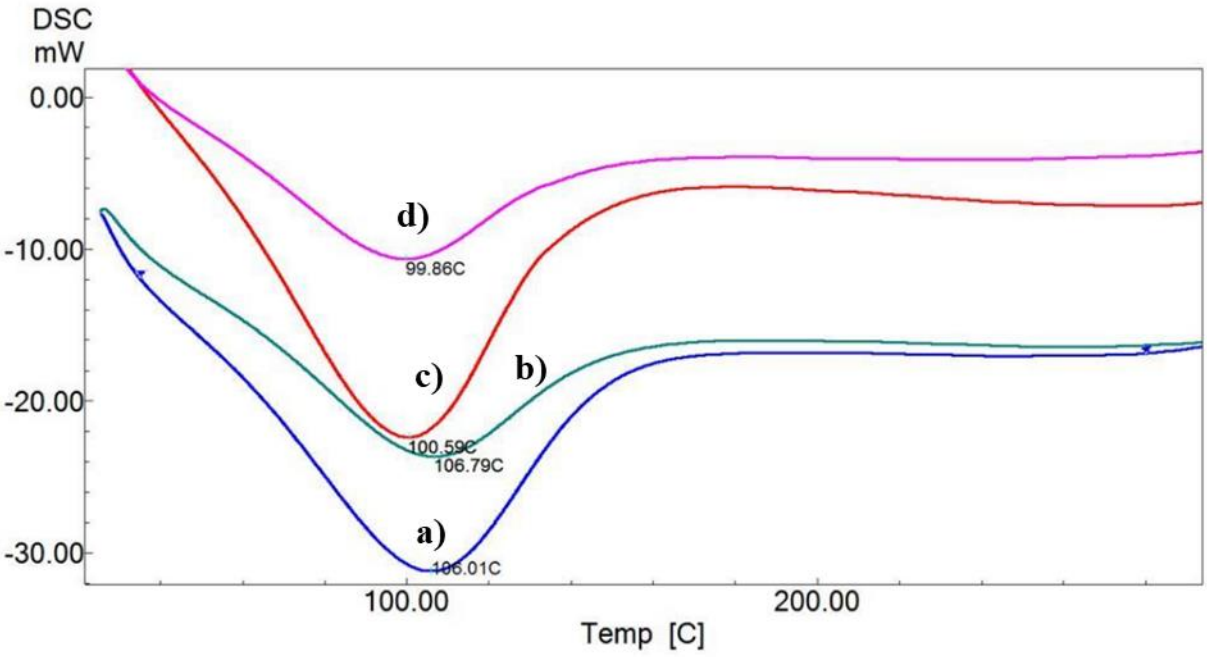
Şekil 3.4 'de gösterildiği gibi, PO_4^{-3} grubuna bağlı HA' nın karakteristik zirveleri 1087, 1018, 962, 628, 597 ve 561 cm^{-1}' dir. 1087-1018 cm^{-1} P-O asimetrik gerilmeyi, 628-561 cm^{-1} P-O bükülmesini ve 962 cm^{-1} P-O simetrik gerilmeyi temsil eder. SA 'nın FTIR spektrumunda, 3239 cm^{-1}, 1592-1405 cm^{-1}' de C=O bağını temsil eden karakteristik bir OH germe titreşimi vardır. HA' nın P-O bağının dejenere olmayan simetrik gerilmesi, 946 cm^{-1} C-O gerilme titreşiminde SA ile etkileşime bağlı olarak 962 cm^{-1}'den 960 cm^{-1}'e kaydırılmıştır. Bölge net temsil için sarı ile renklendirilmiştir. 1592 cm^{-1}, 1405 cm^{-1} ve 1295 cm^{-1}' de SA' nın karboksilat grubunun asimetrik ve simetrik titreşimlerinin HA/SA, HA/SA/0.2 gr Mn, HA/SA/0.6 gr Mn' de bulunmadığı açıktır. Mn elementi HA ve SA ile etkileşime girmediğinden kontrol grubunun spektrumları ile Mn içeren grubun spektrumları (HA/SA/0.2gr Mn, HA/SA/0.6gr Mn ve HA/SA/1gr Mn) arasında önemli ölçüde fark olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3.4. *FTIR spektrumu a)Sodyum Aljinat b)Hidroksiapatit c)Mangan d)Kontrol Grubu e)0.2gr Mn f)0.6gr Mn g)1gr Mn*

3.3. Termal Yapı Analizi

Şekil 3.5'te HA/SA ve HA/SA/Mn' nin DSC termogramlarını göstermektedir (0.2, 0.6, 1). SA' nın erime noktası 100.12 °C'dir. HA/SA ve HA/SA/2 Mn iskelelerinin erime noktası 106 °C' dir. Erime noktaları birbirine yakındır. Dolayısıyla HA varlığının iskelenin erime noktasını arttırdığı, Mn elementinin varlığının da iskelenin erime noktasını bir miktar arttırdığı söylenebilir. Ancak Mn elementinin konsantrasyonunun artmasıyla erime noktası düşmüştür. HA/SA/0.6 gr Mn' nin erime noktası 100.59 °C iken HA/SA/1 gr Mn' nin erime noktası 99.86 °C'dir. Mn' nin varlığı iskelenin erime noktasını önemli ölçüde etkilememiştir. Bunun nedeni konsantrasyonunun düşük olması olabilir.

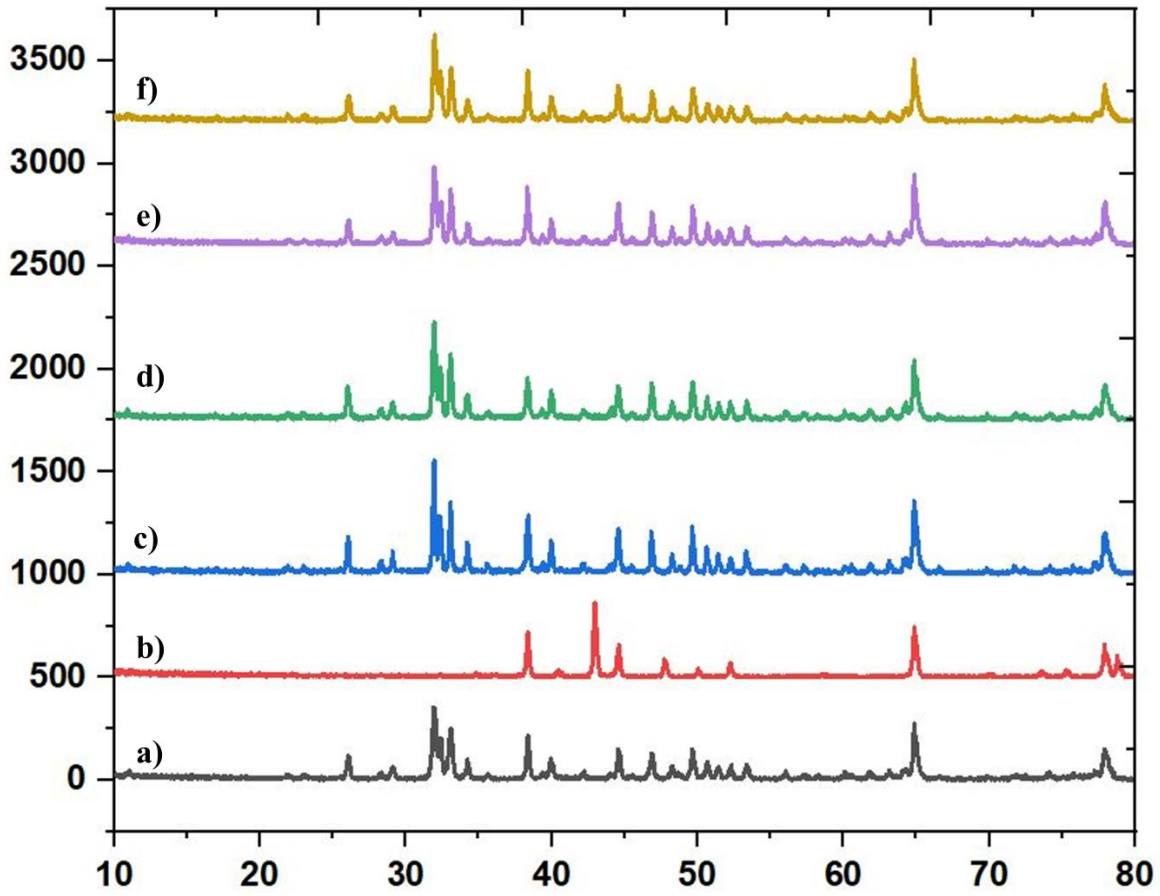


Şekil 3.5. *İskelelere ait DSC termogramları a)Kontrol Grubu b)0.2gr Mn c)0.6gr Mn d)1gr Mn*

3.4. X Işınları Difraktometresi Analizi

X-ışını kırınımı (XRD), malzemelerin kimyasal ve kristal yapılarını ve fiziksel özelliklerini inceleyen bir analizdir. Bu tez çalışmasında hidroksiapatit, mangan, kontrol grubu (SA/HA), SA/HA/0.2 gr Mn, SA/HA/0.6 gr Mn ve SA/HA/1 gr Mn yapı iskelelerinin fiziksel formu (kristal veya amorf), 10–80° kırınım açılarında XRD ile karakterize edilmiştir.

HA'nın XRD spektrumundan elde edilen sonuçlar, 2θ =27.96°, 32.84°, 33.26° ve 34.98°'de görülen kırınım tepe noktalarına sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuç literatür ile kıyaslandığında yaklaşık olarak aynı değerler görülmüştür [47],[48]. Saf mangan elementi için 2θ =38.9°, 44.03°, 44.9° ve 65.01' de görülen kırınım tepe noktalarına sahip olduğu görülmektedir [53]. Sodyum aljinat polimerinin miktarı çok düşük olduğu için ona ait herhangi bir tepe noktası görülmemektedir. 0.2gr Mn, 0.6 gr Mn ve 1 gr Mn içeren iskelelerde HA ve Mn elementine ait tepe noktalarını görmek mümkündür. Ayrıca 2θ =65.01° noktasında görülen tepenin mangan elementinin oranının artmasıyla pikin daha fazla sivri hale geldiği ***Şekil 3.6***' da görülmektedir.



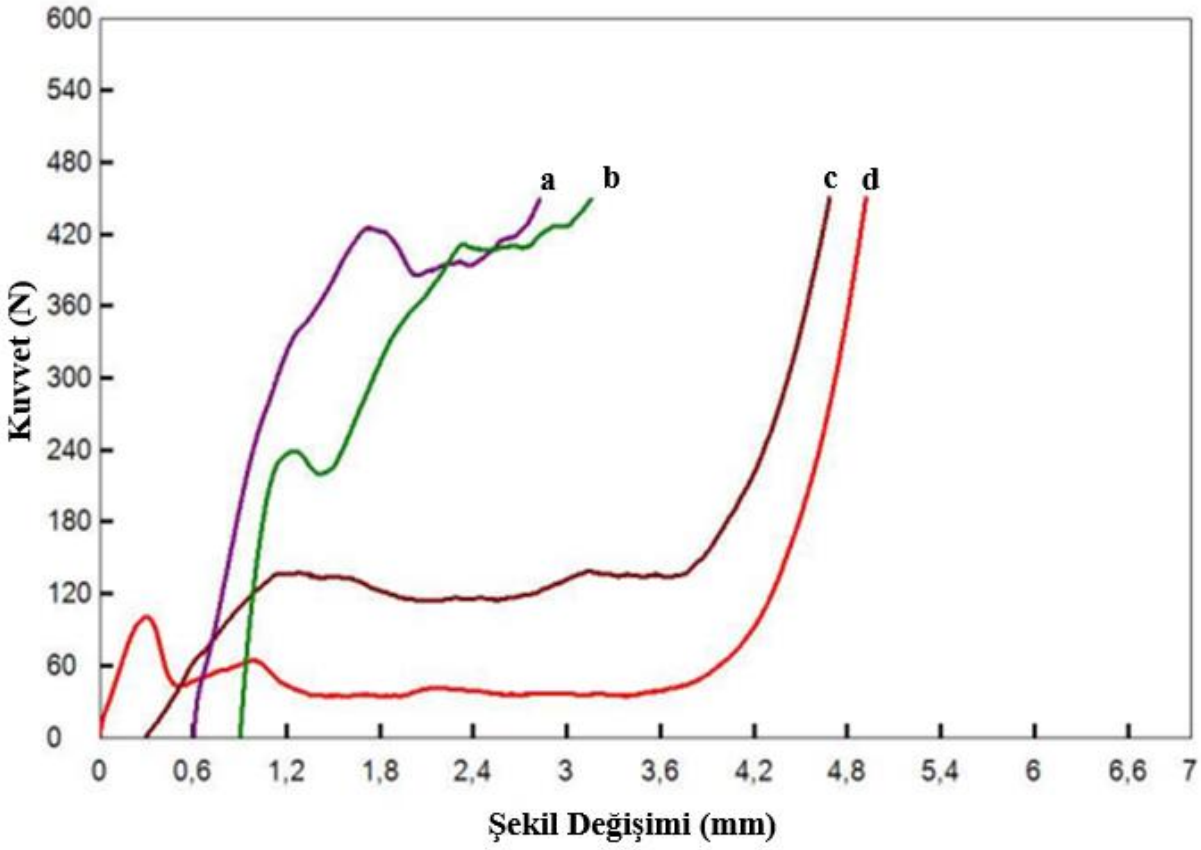
Şekil 3.6. *İskelelerin XRD dağılımı a)Hidroksiapatit b)Mangan c)Kontrol Grubu d)0.2gr Mn e)0.6gr Mn f)1gr Mn*

3.5. Mekanik Analiz

İskelelerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla üretilen kemik doku iskelelerine basma testi yapılmıştır. Tablo 3.7.'de SA/HA iskelesinin en yüksek basma dayanımına (3.19288 MPa) sahip olduğu görülmektedir. 0.2 gr Mn, 0.6 gr Mn, ve 1 gr Mn içeren kemik iskelelerinin yaklaşık olarak eşit derecede düşük basma dayanımına (3.05155 MPa) sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum doku iskelelerine Mn elementinin eklenmesiyle basınç dayanımlarının azaldığını göstermektedir. Ancak şekil değişimi değerleri karşılaştırıldığında en fazla şekil değişiminin %4.91825 değer ile SA/HA kemik iskelesinin olduğu tabloda görülmektedir. En az şekil değişiminin ise %2.23025 değer ile 0.6 gr Mn olduğu bildirilmiştir. Bu durumda Mn elementinin eklenmesi kırılganlığı azalttığı söylenebilir. Şekil 3.7' de mangan oranının artmasıyla şekil değişiminin düştüğü görülmektedir.

Tablo 3.1. *Basma testi sonuçları*

	Max_Gerilme (N/mm^2)	Max_Şekil Değişimi (%)
Kontrol Grubu	3.19288	4.91825
0.2 gr Mn	3.05155	4.38488
0.6 gr Mn	3.05199	2.23025
1 gr Mn	3.00038	2.25675

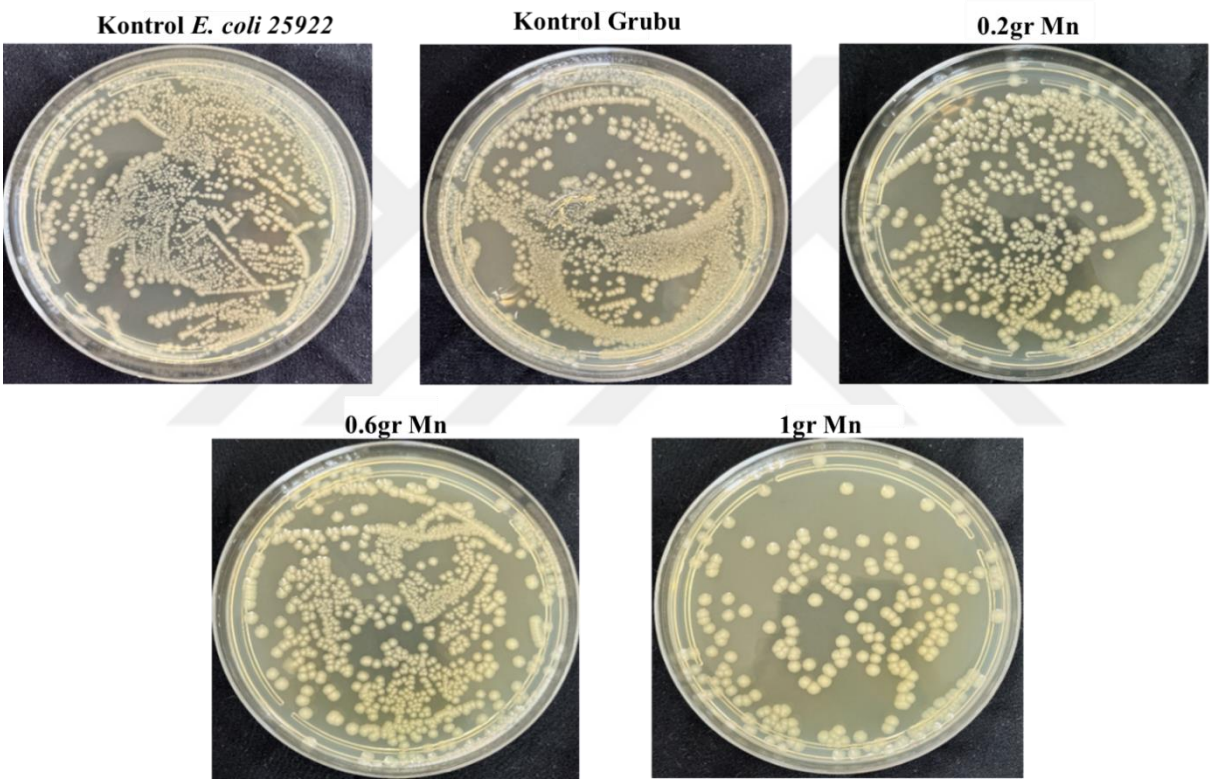


Şekil 3.7. *Kuvvet-Şekil Değişimi grafiği a) 0.6gr Mn b) 1gr Mn c) 0.2gr Mn d) Kontrol grubu*

3.6. Antibakteriyel Test

Saf SA/HA, 0.2 gr Mn, 0.6 gr Mn ve 1 gr Mn yüklü doku iskeleleri *Escherichia coli* gram negatif bakterileri ile koloni sayımı yöntemi kullanılarak antibakteriyel testi gerçekleştirilmiştir. Testi yapılan örnekler 5 ml LB (Lysogeny Broth) sıvı besiyeri içerisine eklenip bakteri kültürü 24 saat boyunca 37ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonrasında seri dilüe edildikten sonra TSA (Tryptic Soy Agar) besiyerine yayma ekimi yapılarak bir gece

37^{o}C inkübasyon sonrasında koloni sayımı yapılmıştır. % inhibisyon oranı içerisinde örnek içermeyen bakteri kontrolü ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Tablo 3.2’ de görüldüğü gibi başlangıçta örnek içermeyen yaklaşık olarak 2000 koloni ile teste başlanmıştır. Saf SA/HA doku iskelesinde herhangi bir antibakteriyel etki görülmemiştir. 0.2 gr Mn içeren örnekte %47.6 0.6 gr Mn içeren örnekte %56.6, 1gr Mn içeren örnekte %90.25 oranlarında bakteri inhibisyonu görülmüştür. Şekil 3.8’ de Mn oranının artması ile bakterilerdeki düşüş net bir şekilde görülmektedir. Testin sonucunda Mn oranının artması ile antibakteriyel özelliğin oldukça fazla bir şekilde arttığı söylenebilir. Nawaz, Qaisar, et al.’ın yaptıkları çalışmada Mn elementinin hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerilere karşı etkili olduğu görülmüştür [50].



Şekil 3.8. *Escherichia coli gram negatif bakterisi ile yapılan antibakteriyel aktivite sonuçları*

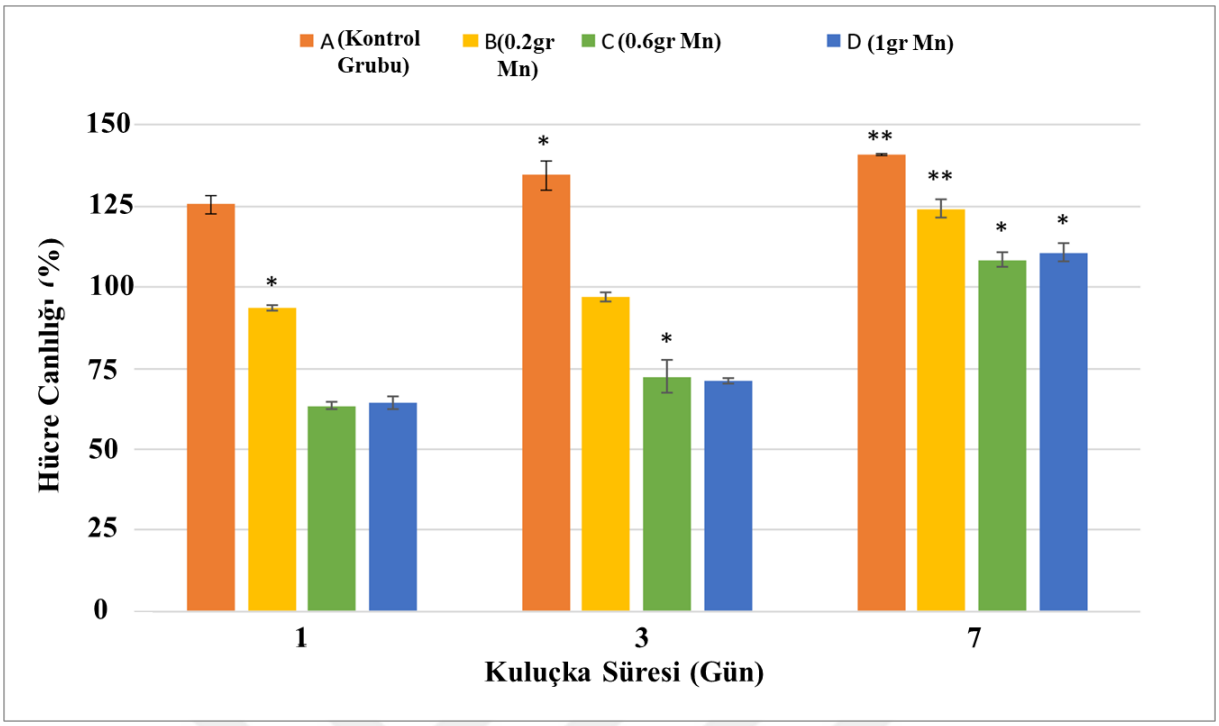
Tablo 3.2. *Koloni Sayımı*

	Koloni miktarı	% İnhibisyon
Kontrol *E. coli 25922*	~2000	
Kontrol Grubu	~2000	%0
0.2gr Mn	~1048	%47.6
0.6gr Mn	~868	%56.6
1gr Mn	~195	%90.25

3.7. Hücre Kültürü Analizi

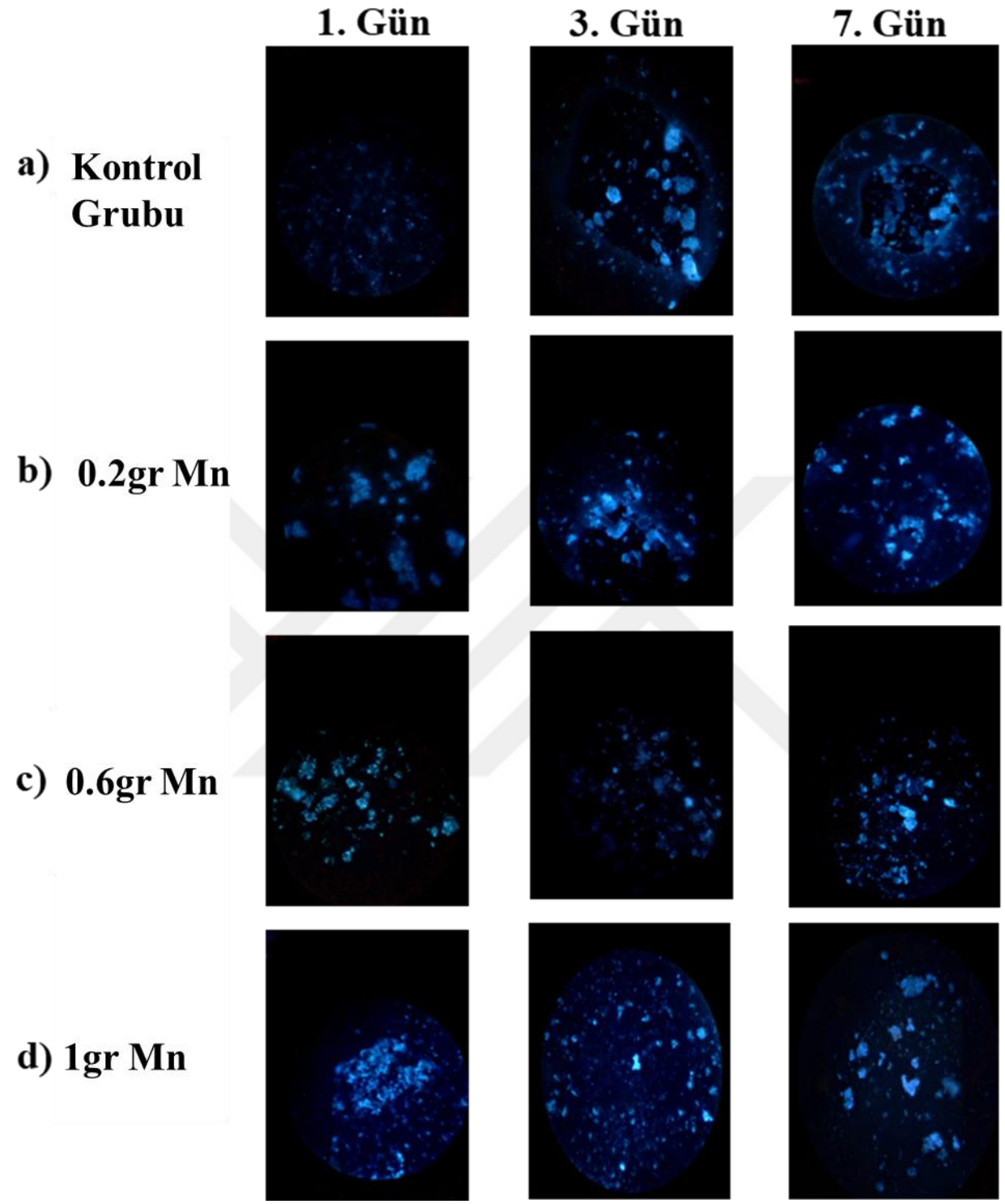
Kemik doku mühendisliği için hazırlana 3B baskılı SA/HA, SA/HA/0.2 gr Mn, SA/HA/0.6 gr Mn ve SA/HA/1 gr Mn yapı iskelelerindeki canlılık osteoblast hücreleri kullanılarak MTT analizi ile belirlendi. İskelelerin osteoblast hücre canlılığını belirlemek için 1, 3 ve 7 günlük inkübasyon boyunca MTT tahlili yapıldı. Başlangıçta üretilen doku iskelelerinin hücre canlılığı benzerdi. 3.gün grupların hepsinde hücre canlılığında artış görülmüştür. Hücre canlılığının en fazla artış olan grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir. 7. günün sonunda Mn katkılı doku iskelelerin hücre canlılığında kontrol grubuna göre büyük bir artış görülmüştür.

Şekil 3.9’ da gösterilen sonuçlara göre SA/HA, SA/HA/0.2 gr Mn, SA/HA/0.6 gr Mn ve SA/HA/1 gr Mn, geliştirilen iskelelerinin tamamının osteoblast hücreleri üzerinde herhangi bir toksisiteye neden olmadığı görülmektedir. Fakat Mn artışı hücre canlılığını bir miktar düşürmüştür. Kumar ve ark. hem yüklü hem de yüksüz bileşenlerin HA numunelerinde osteoblastik büyümenin desteklendiğini ve 7 gün boyunca hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu yapılan MTT testi ile görülmüştür. Ayrıca HA yüzeyindeki hem negatif hem de pozitif yüklerin osteoblast hücresinin metabolik aktivitesinde artışa neden olduğu söylenebilir [48],[51].



Şekil 3.9. *1, 3 ve 7 günlük kuluçka süresinden sonra 3B kemik iskelelerin MTT tahlili*

Şekil 3.10'da görüldüğü yapı iskelelerine yapılan hücre canlılık testinin sonucunda alınmış floresan görüntüleri ile hücrelerin yapı üzerinde dağıldığı gözlenmiştir.



Şekil 3.10. *3D baskılı a) Kontrol (SA/HA), b) SA/HA/0.2gr Mn, c) SA/HA/0.6gr Mn ve d) SA/HA/1gr Mn iskelelerinin 1, 3 ve 7 günlük floresan mikroskobu görüntüleri*

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında ilk olarak seramik yapılı kompozit bir biyomürekkep hazırlanmış ve 3B yazıcı ile 30 katmanlı bir kemik iskelesi elde edilmiştir. Üretilen bu kemik iskelelerinin morfolojik, kimyasal, mekanik, antimikrobiyal ve hücre kültürü analizleri incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Basımı yapılan kemik iskelelerinde homojen porların olması ve hücre büyümesine katkı sağlayacak por boyutlarına sahip olmasına dikkat edilmiştir. İskelelerin por boyutları yaklaşık olarak 350-650 μm olarak ölçülmüştür. Maksimum por boyutunun 1 gr Mn içeren kemik iskelesinde görülmüştür. Bunun en temel sebebi hazırlanan biyomürekkebin viskozitesinin daha fazla olması ile katman çıkılırken yayılmamasıdır. FTIR analizi sonucunda HA ve SA'nın karakteristik pikleri gözlenmiştir. Mangan elementi ilavesi ile piklerde herhangi bir kayma olmamıştır. Kemik iskelelerinin termal analizi sonucunda kompozit iskelelerin erime noktasının yaklaşık 100℃'de piklere sahip olduğu görülmektedir. XRD analizi sonucunda HA ve Mn'nin sahip olduğu karakteristik tepe noktaları gözlenmiştir. Mangan elementinin oranının artması ile karakteristik pikin dahada sivri hal aldığı test sonucunda görülmüştür. Mekanik test sonucunda kemik iskelelerinin yaklaşık 3 MPa değerine sahip olduğu gözlenmiştir. Üretilen kemik iskelelerinin basma dayanımları doğal süngerimsi kemiğin modülüsü olan 1.9-7.0 MPa arasındadır. Kemik iskelelerinde kullanılan mangan elementinin antimikrobiyal aktivitesinin olduğu test sonucunda görülmüştür. Mangan elementinin en fazla miktarda kullanıldığı 1 gr Mn kemik iskelesinde yaklaşık olarak %90.25 bakteri inhibisyonu görülmüştür. Daha az kullanıldığı iskelelerde bile yüksek oranlarda inhibisyon tespit edilmiştir. Sonuç olarak mangan elementi gram negatif bakterilere karşı yüksek oranda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Son olarak yapılan hücre kültürü analizi sonucunda iskelelerde herhangi bir toksik etki görülmemiştir. Fakat mangan elementinin artması ile hücre canlılığındaki artış azalmıştır. Hücre canlılığının en fazla olduğu kemik iskelesi 0.2 gr Mn içeren olduğu yapılan test sonucu görülmüştür. Sonuç olarak mangan elementinin antimikrobiyal olduğu ve toksik bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

5.KAYNAKLAR

[1] Li, Y., Chen, S. K., Li, L., Qin, L., Wang, X. L., & Lai, Y. X. (2015). Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. Journal of Orthopaedic Translation, 3(3), 95–104. https://doi.org/10.1016/j.jot.2015.05.002

[2] Tian, L., Zhang, Z., Tian, B., Zhang, X., & Wang, N. (2020). Study on antibacterial properties and cytocompatibility of EPL coated 3D printed PCL/HA composite scaffolds. RSC Advances, 10(8), 4805–4816. doi:10.1039/c9ra10275b

[3] Fernandez-Bances, I., Perez-Basterrechea, M., Perez-Lopez, S., Batalla, D. N., Rodriguez, M. A. F., Alvarez-Viejo, M., ... & Hernandez, J. O. (2013). Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft. Cytotherapy, 15(5), 571-577.

[4] Kavya, K. C., Jayakumar, R., Nair, S., & Chennazhi, K. P. (2013). Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO2 composite scaffold for bone tissue engineering. International journal of biological macromolecules, 59, 255-263.

[5] Greenwald, A. S., Boden, S. D., Goldberg, V. M., Khan, Y., Laurencin, C. T., & Rosier, R. N. (2001). Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *Jbjs*, *83*(2), S98-103.

[6] Wang, H., Xu, T., & Shou, B. (2016). Determination of material strengths by hydraulic bulge test. *Materials*, *10*(1), 23.

[7] HURİ, P. Y., HASIRCI, N., & HASIRCI, V. (2010). Kemik doku mühendisliği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *19*(4), 206-219.

[8] Tian, L., Zhang, Z., Tian, B., Zhang, X., & Wang, N. (2020). Study on antibacterial properties and cytocompatibility of EPL coated 3D printed PCL/HA composite scaffolds. *RSC advances*, *10*(8), 4805-4816.

[9] Farokhi, M., Mottaghitalab, F., Samani, S., Shokrgozar, M. A., Kundu, S. C., Reis, R. L., ... & Kaplan, D. L. (2018). Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue

engineering. *Biotechnology advances*, *36*(1), 68-91.

[10] Zhou, H., & Lee, J. (2011). Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, *7*(7), 2769-2781.

[11] Schatkoski, V. M., do Amaral Montanheiro, T. L., de Menezes, B. R. C., Pereira, R. M., Rodrigues, K. F., Ribas, R. G., ... & Thim, G. P. (2021). Current advances concerning the most cited metal ions doped bioceramics and silicate-based bioactive glasses for bone tissue engineering. *Ceramics International*, *47*(3), 2999-3012.

[12] Wei, S., Ma, J. X., Xu, L., Gu, X. S., & Ma, X. L. (2020). Biodegradable materials for bone defect repair. *Military medical research*, *7*(1), 1-25.

[13] Li, S., Abdel-Wahab, A., & Silberschmidt, V. V. (2013). Analysis of fracture processes in cortical bone tissue. *Engineering Fracture Mechanics*, *110*, 448-458.

[14] Chaturvedi, A. (2022). A Review of Polymer Physics and Potential Applications to Radiation Biophysics and Neurodegenerative Disorders. *Earthline Journal of Mathematical Sciences*, *9*(1), 131-143.

[15] Lisa, A. U., Michael, L. C., Jane, B. R., Steven, A. W., Robert, B. J., Peter, V. M., & Neil, A. C. (2010). *Campbell Biology*. Benjamin Cummings/Pearson.

[16] Sivakumar, P. M., Yetisgin, A. A., Demir, E., Sahin, S. B., & Cetinel, S. (2023). Polysaccharide-bioceramic composites for bone tissue engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126237.

[17] Guo, X., Song, P., Li, F., Yan, Q., Bai, Y., He, J., ... & Su, Z. (2023). Research progress of design drugs and composite biomaterials in bone tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 3595-3622.

[18] Xue, N., Ding, X., Huang, R., Jiang, R., Huang, H., Pan, X., ... & Wang, Y. (2022). Bone tissue engineering in the treatment of bone defects. Pharmaceuticals, 15(7), 879.

[19] Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue

engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, *30*(10), 546-554.

[20] Booij, R., Kämmerling, N. F., Oei, E. H., Persson, A., & Tesselaar, E. (2023). Assessment of visibility of bone structures in the wrist using normal and half of the radiation dose with photon-counting detector CT. *European Journal of Radiology*, *159*, 110662.

[21] Fan, P., Jin, F., Qin, Y., Wu, Y., Yang, Q., Liu, H., & Li, J. (2023). Multiscale 3D bioprinting for the recapitulation of lung tissue. *International Journal of Bioprinting*, 1166.

[22] Huang, C. H., & Yoshimura, M. (2023). Biocompatible hydroxyapatite ceramic coating on titanium alloys by electrochemical methods via Growing Integration Layers [GIL] strategy: A review. *Ceramics International*.

[23] Dil, E. J., Ajji, A., & Saffar, A. (2023). Polyester Materials in Biomedical Applications. *Polyester Films: Materials, Processes and Applications*, 306-342.

[24] Li, A., Sasaki, J. I., Abe, G. L., Katata, C., Sakai, H., & Imazato, S. (2023). Vascularization of a Bone Organoid Using Dental Pulp Stem Cells. *Stem Cells International*, *2023*.

[25] Alagöz, A. S. (2016). *Bone tissue engineering using macroporous PHA-PLA and PHBV scaffolds produced by additive manufacturing and wet spinning* [Ph.D. - Doctoral Program]. Middle East Technical University.

[26] Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of materials science*, *44*, 5713-5724.

[27] Cox, S. C., Thornby, J. A., Gibbons, G. J., Williams, M. A., & Mallick, K. K. (2015). 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, *47*, 237-247.

[28] Collins, M. N., Ren, G., Young, K., Pina, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2021). Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering. *Advanced functional materials*, *31*(21), 2010609.

[29] Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., & Kenny, J. M. (2010).

Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer degradation and stability*, *95*(11), 2126-2146.

[30] Costantini, M., & Barbetta, A. (2018). Gas foaming technologies for 3D scaffold engineering. In *Functional 3D tissue engineering scaffolds* (pp. 127-149). Woodhead Publishing.

[31] Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., ... & Shu, W. (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive materials*, *3*(3), 278-314.

[32] Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., & Laurencin, C. T. (2015). Biomaterials for bone regenerative engineering. *Advanced healthcare materials*, *4*(9), 1268-1285.

[33] Duymaz, B. T., Erdiler, F. B., Alan, T., Aydogdu, M. O., Inan, A. T., Ekren, N., ... & Gunduz, O. (2019). 3D bio-printing of levan/polycaprolactone/gelatin blends for bone tissue engineering: Characterization of the cellular behavior. *European Polymer Journal*, *119*, 426-437.

[34] Nawaz, Q., Rehman, M. A. U., Burkovski, A., Schmidt, J., Beltrán, A. M., Shahid, A., ... & Boccaccini, A. R. (2018). Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *29*, 1-13.

[35] Megat Abdul Wahab, R., Abdullah, N., Zainal Ariffin, S. H., Che Abdullah, C. A., & Yazid, F. (2020). Effects of the sintering process on nacre-derived hydroxyapatite scaffolds for bone engineering. *Molecules*, *25*(14), 3129.

[36] Nasri-Nasrabadi, B., Kaynak, A., Heidarian, P., Komeily-Nia, Z., Mehrasa, M., Salehi, H., & Kouzani, A. Z. (2018). Sodium alginate/magnesium oxide nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers for Advanced Technologies*, *29*(9), 2553-2559.

[37] Guo, L., Liang, Z., Yang, L., Du, W., Yu, T., Tang, H., ... & Qiu, H. (2021). The role of natural polymers in bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, *338*, 571-582.

[38] Muthusamy, S., Mahendiran, B., Sampath, S., Jaisankar, S. N., Anandasadagopan, S. K., & Krishnakumar, G. S. (2021). Hydroxyapatite nanophases augmented with selenium and manganese ions for bone regeneration: Physiochemical, microstructural and biological characterization. *Materials Science and Engineering: C*, *126*, 112149.

[39] Chen, Q., Zhu, C., & Thouas, G. A. (2012). Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. *Progress in Biomaterials*, *1*, 1-22.

[40] Schatkoski, V. M., do Amaral Montanheiro, T. L., de Menezes, B. R. C., Pereira, R. M., Rodrigues, K. F., Ribas, R. G., ... & Thim, G. P. (2021). Current advances concerning the most cited metal ions doped bioceramics and silicate-based bioactive glasses for bone tissue engineering. *Ceramics International*, *47*(3), 2999-3012.

[41] Westhauser, F., Wilkesmann, S., Nawaz, Q., Hohenbild, F., Rehder, F., Saur, M., ... & Boccaccini, A. R. (2021). Effect of manganese, zinc, and copper on the biological and osteogenic properties of mesoporous bioactive glass nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *109*(8), 1457-1467.

[42] Muthusamy, S., Mahendiran, B., Sampath, S., Jaisankar, S. N., Anandasadagopan, S. K., & Krishnakumar, G. S. (2021). Hydroxyapatite nanophases augmented with selenium and manganese ions for bone regeneration: Physiochemical, microstructural and biological characterization. *Materials Science and Engineering: C*, *126*, 112149.

[43] Yu, L., Rowe, D. W., Perera, I. P., Zhang, J., Suib, S. L., Xin, X., & Wei, M. (2020). Intrafibrillar mineralized collagen–hydroxyapatite-based scaffolds for bone regeneration. *ACS applied materials & interfaces*, *12*(16), 18235-18249.

[44] Muthusamy, S., Mahendiran, B., Sampath, S., Jaisankar, S. N., Anandasadagopan, S. K., & Krishnakumar, G. S. (2021). Hydroxyapatite nanophases augmented with selenium and

manganese ions for bone regeneration: Physiochemical, microstructural and biological characterization. *Materials Science and Engineering: C*, *126*, 112149.

[45] Nawaz, Q., Rehman, M. A. U., Burkovski, A., Schmidt, J., Beltrán, A. M., Shahid, A., ... & Boccaccini, A. R. (2018). Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *29*, 1-13.

[46] İbrahim, U. S. L. U. (2009). Elektro-eğirme yöntemi bor katkılı aluminyum asetat nanolif malzemelerin eldesi. *Tübav Bilim Dergisi*, *2*(3), 266-270.

[47] Erzengin, S., Guler, E., Eser, E., Polat, E. B., Gunduz, O., & Cam, M. E. (2022). In vitro and in vivo evaluation of 3D printed sodium alginate/polyethylene glycol scaffolds for sublingual delivery of insulin: Preparation, characterization, and pharmacokinetics. *International Journal of Biological Macromolecules*, *204*, 429-440.

[48] Tut, T. A., Cesur, S., Ilhan, E., Sahin, A., Yildirim, O. S., & Gunduz, O. (2022). Gentamicin-loaded polyvinyl alcohol/whey protein isolate/hydroxyapatite 3D composite scaffolds with drug delivery capability for bone tissue engineering applications. *European Polymer Journal*, *179*, 111580.

[49] Kalkandelen, C., Ulag, S., Ozbek, B., Eroglu, G. O., Ozerkan, D., Kuruca, S. E., ... & Gunduz, O. (2019). 3D printing of gelatine/alginate/β-tricalcium phosphate composite constructs for bone tissue engineering. *ChemistrySelect*, *4*(41), 12032-12036.

[50] Nawaz, Q., Rehman, M. A. U., Burkovski, A., Schmidt, J., Beltrán, A. M., Shahid, A., ... & Boccaccini, A. R. (2018). Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials*

Science: Materials in Medicine, *29*, 1-13.

[51] Kumar, D., Gittings, J. P., Turner, I. G., Bowen, C. R., Bastida-Hidalgo, A., & Cartmell, S. H. (2010). Polarization of hydroxyapatite: Influence on osteoblast cell proliferation. *Acta biomaterialia*, *6*(4), 1549-1554.

[52] Chen, Q., Zhu, C., & Thouas, G. A. (2012). Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. *Progress in Biomaterials*, *1*, 1-22.

[53] Mironova-Ulmane, N., Kuzmin, A., Skvortsova, V. N., Chikvaidze, G., Sildos, I., Grabis, J., ... & Maiorov, M. M. (2018). Synthesis and vibration spectroscopy of nano-sized manganese oxides.