

Investigation of the Cellular Behavior of Polycaprolactone-Hydroxyapatite Tissue Materials Produced with Bioprinter

Erdi Bulus (Corresponding author)
Kocaeli University, Institute of Science and Technology,
Polymer Science and Technology Program, Kocaeli, Turkey
Istanbul Arel University AreIPOTKAM
(Polymer Technologies and Composite Applications and Research Center), Istanbul, Turkey
E-mail: erdibulus@arel.edu.tr

Yesim Muge Sahin
Istanbul Arel University AreIPOTKAM
(Polymer Technologies and Composite Applications and Research Center), Istanbul, Turkey
Istanbul Arel University, Faculty of Engineering and Architecture, Biomedical Engineering
Department, Istanbul, Turkey
E-mail: ymugesahin@arel.edu.tr

Hakan Darici
Istinye University, Faculty of Medicine,
Department of Histology and Embryology, Istanbul, Turkey
E-mail: hdarici@istinye.edu.tr

Leyla Turker Sener
Istanbul University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Istanbul, Turkey
Istanbul University, TETLAB (3B Medical and Industrial Design Laboratory), Istanbul, Turkey
E-mail: leylaturker@hotmail.com

Abstract

One of the most remarkable technologies for developing tissue engineering and artificial organ systems is 3D printers. 3D printers are a very fast developing technology that enables you to produce 3D solid objects from virtually virtualized data. Almost all 3D science printers used in the field of bioprinter, medical applications in the production of tissue and organ production has come forward. The first biological material printed with bioprinter is a supporting structure for bone tissue. In recent years, with the spread of this technology, live tissues such as cartilage, skin, heart valve and aortic vein have been produced. Bioprinter technology, organ transplantation related to the negativity of the tissue and organ regeneration are thought to be very important functions. In this study, tissue material production was produced by synthesized hydroxyapatite (MSSHA) bioceramics from seashells supplemented with polycaprolactone (PCL) matrix. MSSHA bioceramics were synthesized from sand shells (*Donax trunculus*) seashells by chemical agitation. Characterization studies of bioceramic and tissue scaffolds, structural (X-ray Crystallography (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), thermal (Thermal Gravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimeter (DSC)), morphological (Field Emission Gun Scanning Electron Microscope) (FEGSEM), mechanical (Tensile) and biological (Cell Culture) analysis, based on the analysis values can be used in the major tissue engineering applications that can adapt to the body and biodegradable as alternative tissue material has been determined.

Keywords: Tissue Engineering, Seashells, Hydroxyapatite, Bioceramic, Polycaprolactone, Bioprinter, Tissue Material.

Biyoyazıcı İle Üretilen Polikaprolakton-Hidroksiapatit Doku Materyallerinin Hücresel Davranışlarının İncelenmesi

Özet

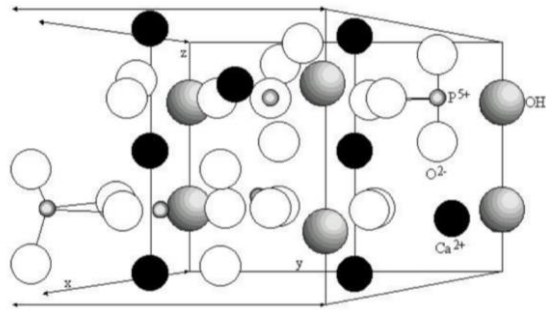
Gelişen doku mühendisliği ve yapay organ sistemlerine yönelik olarak günümüzde dikkat çeken teknolojilerden biride 3 boyutlu yazıcıdır. 3 boyutlu yazıcılar, sanal olarak tasarlanan datalardan 3 boyutlu katı objeler üretmeyi sağlayan, çok hızlı gelişen bir teknolojidir. Neredeyse bilimin her alanında kullanılan 3 boyutlu yazıcılar, biyoyazıcı olarak tıbbi uygulamalarda doku ve organ üretimini hedefleyen çalışmalarda öne çıkmıştır. Biyoyazıcılar ile basılan ilk biyolojik malzeme kemik dokusu için üretilen destekleyici bir yapıdır. Son yıllarda bu teknolojinin yaygınlaşması ile birlikte kırık, deri, kalp kapağı ve aort damarı gibi canlı dokular üretilmiştir. Biyoyazıcı teknolojisi, organ nakliyle ilgili yaşanan olumsuzluklar için doku ve organ yenilenmesinde çok önemli işlevler yerine getirebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada doku materyali üretimi polikaprolakton (PCL) matrisine takviye edilmiş deniz kabuklarından sentezlenmiş hidroksiapatit (DKSHA) biyoseramikleri ile üretilmiştir. DKSHA biyoseramikleri, kum şırlanı (*Donax trunculus*) deniz kabuklarından kimyasal çöktürme yöntemi ile sentezlenmiştir. Biyoseramik ve doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları, yapısal (X Işını Kristalografisi (XRD), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), termal (Termal Gravimetrik Analiz (TGA), Difransiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı (DSC)), morfolojik (Alan Emisyon Tabanlı Taramalı Elektron Mikroskopu (FEGSEM)), mekanik (Çekme) ve biyolojik (Hücre Kültürü) analizler ile gerçekleştirilmiştir. Analiz değerleri esas alındığında başlıca doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek vücuda uyum sağlayabilen ve biyolojik olarak parçalanabilir alternatif doku materyali olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Doku Mühendisliği, Deniz Kabukları, Hidroksiapatit, Biyoseramik, Polikaprolakton, Biyoyazıcı, Doku Materyali.

1. Giriş

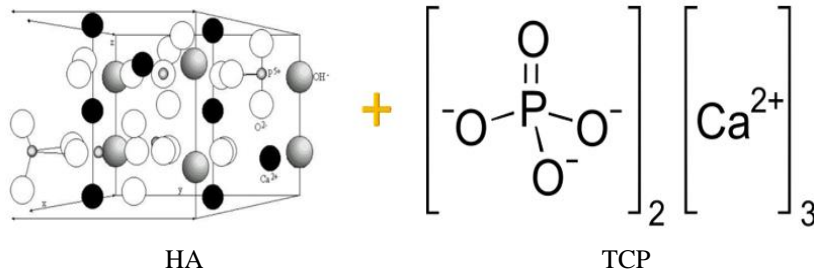
Doku mühendisliği, kaza ve yaralanmalar sonucunda hasar görmüş biyolojik dokuları iyileştirmek veya değiştirmeye yönelik hücre, mühendislik ve malzeme üçlü kombinasyon sistemlerinin ve uygun biyokimyasal ve fizikokimyasal faktörlerin kullanılması ile multidisipliner bir uygulama alanıdır. Tıbbi uygulamalarda dokunun oluşabilmesi için doku iskelelerinin kullanılmasını içermektedir. Organ yetmezliği, klinik uygulamalarda oldukça ciddi sorunlarından birisidir. Hastaların birçoğu için tek tedavi seçeneği, hasarlı doku ve organları için nakil listesinde kendilerine uyan doku veya organın belirmesini umutla beklemektir. Ancak gelişen doku mühendisliği ve yapay organ sistemleri, bilinen organ nakillerindeki doku reddi ve benzeri sorunların da bir yandan çözüme ulaşmasını sağlamak için ortaya çıkmıştır [1]. Geleneksel teknikler ile üretilen malzemelere alternatif olarak biyoyazıcı teknolojisi ortaya çıkmıştır. Burada hastanın gerekli bölgesinin bilgisayarlı tomografisi (BT) çekilerek birebir üretimi yapılabilmektedir. Üç boyutlu yazıcı teknolojisinin temelleri 1986 yılında Charles Hull tarafından atılmıştır. Bu teknoloji özellikle doku mühendisliği ve yenileyici (rejeneratif) tıp alanlarında önem arz etmektedir. Kuzey İrlanda'da biyoyazıcı teknolojisinden faydalanılarak üretilen karaciğer, ilk kez üç yaşındaki bir çocuğa nakledilerek organ nakli sırası bekleyen insanlara umut ışığı olmuştur [2]. Biyolojik aktivasyon (biyoaktiflik), malzeme arayüzlerinde meydana gelen özel bir biyolojik reaksiyon ile bağ oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Aktivitesi yüksek biyoseramikler, insan vücudunda yeralan kollajen doku lifleri ile tepkimeye girerek arayüzeyde hidroksi karbona apatit (HCA) oluşumu sağlamaktadır. Bu tabaka, fiziksel ve kimyasal açıdan canlı kemiği ile benzer yapıdadır. Doku ve organlar ile implant malzemesinin arayüzeyinde meydana gelen bu tabaka, bağlanma mevcudiyetinin bir göstergesi olmaktadır [3]. İmplant ya da doku destek materyali olarak kullanılabilecek biyomalzemelerin insan dişi ve kemiği ile benzer özellikler göstermesi beklenmektedir. Vücudumuz oturma, durma ve koşma gibi günlük aktivitelerde, devamlı olarak tekrarlanabilir yüklere maruz kalmaktadır. Vücudumuzda kullanılabilecek biyomalzemelerin mukavemetli olmaları ve ani gerilmelere dayanabilecek özellikte olması istenmektedir [4]. Biyoseramikler vücut içerisinde genellikle iskelet sisteminin onarımı için kullanılmaktadır. Biyoseramikler; tek kristalli, çok kristalli, cam, cam seramik veya kompozit şeklinde değişik fazlarda üretilmektedir. Değişik fazlardaki biyoseramiklerin farklı özelliklerde olmasından dolayı işlevleri de farklı olmaktadır [5]. Beta trikalsiyum fosfat (β -TCP), kortikal ve trabeküler kemik içi hasarların tedavisinde kullanılan biyoyoumluluğa ve biyoaktifliğe sahip bir biyoseramik malzemedir. β -TCP ve HA gibi biyoseramikler, iyi biyoyoumluluk ve bazı durumlarda biyobozunurlulukları nedeniyle kemik dokusu rejenerasyonu için umut verici biyomedikal malzemelerdir, fakat bu biyoseramiklerin dezavantajı düşük mekaniksel kırılabilirliğe sahip olmalarıdır. HA bileşiğinin formülü $Ca_5(PO_4)_3(OH)$

şeklinde olmaktadır. HA biyoseramiği fevkalade biyoyumluluğu ve biyoaktifliği sebebi ile kompozit üretiminde polimerin yapışmasını ve kemik oluşumunu arttırdığı için tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Gözenekli yapıya sahip HA ortopedik cerrahi uygulamalarında kemik grefti olarak kullanılmaktadır. Bu yapı insan kemiğinin mineral fazına en yakın, kalsiyum fazı olarak kabul edilmektedir. HA, insan ve hayvan kemiklerine greftlendikleri zaman toksik olmayan koruyucu yapısal özellik göstermektedir. HA biyoseramiğinin kemik gelişimine olan etkisi, gözenek büyüklüğü, gözeneklerin birbiriyle olan bağlantıları ve kimyasal yapı gibi birçok önemli kritere bağlıdır [3]. HA kristal yapısı Şekil 1’de yer almaktadır.



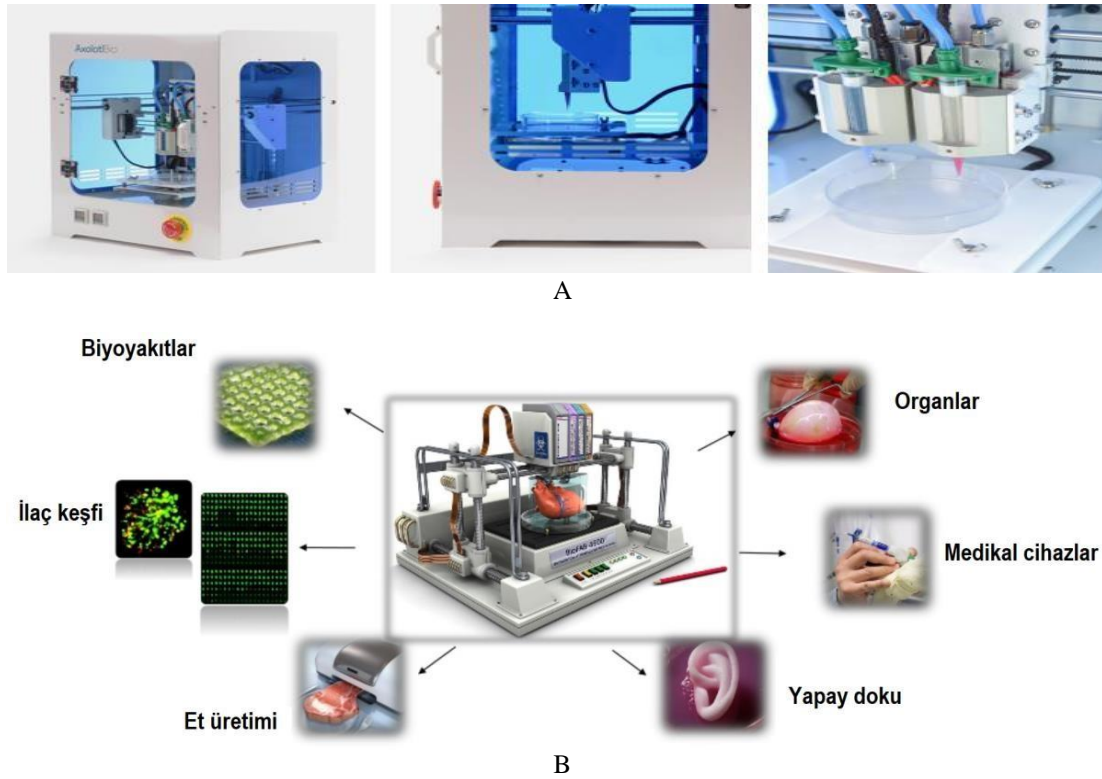
Şekil 1. HA kristal yapısı [3]

Bifazik seramikler (HA+TCP) sayesinde HA'nın çözünmeme ve TCP'nin çok çabuk çözünme ve dağılma sorunlarının önüne geçilebilmektedir. Böylece hem çatı vazifesini istenilen şekilde yerine getirmesi hem de çözünmenin gereken zamanda gerektiği kadar olması sağlanarak hücre nüfuziyetine izin vermesi temin edilmiş olmaktadır [6]. Bifazik malzeme kimyasal yapısı Şekil 2’de yer almaktadır.



Şekil 2. Bifazik malzeme kimyasal yapısı [3]

Biyoyumluluğu yüksek polimer malzemeler, doku mühendisliği ve biyomedikal uygulamalarında kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, biyoyumlu polimerler (biyopolimerler) biyomalzeme olarak kullanıldıklarında birtakım problemler ortaya çıkmaktadır. Bunlar; in vivo ortamdaki bozunabilme potansiyelleri ve doğal dokuyla eşleşmeyen zayıf mukavemet özellikleridir. Biyoseramik ve biyopolimerlerde gözlemlenen bu eksiklikleri aşmak için; kemik doku mühendisliği iskelelerinin hazırlanması amacıyla kullanılan seramik/polimer kompozit malzemeler ortaya çıkmıştır. Biyoseramikler ve biyopolimerler ile hazırlanan gözenekli kompozit biyomalzeme iskeleleri çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır [3]. Yapılan bu çalışmada biyoyazıcı ile biyoyumlu ve biyobozunur doku destek materyali üretimi deniz kabuklarından sentezlenen biyoseramik takviyeli polimer matris ile sağlanmıştır. Biyoseramik ve doku destek materyalinin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek doku destek materyali üzerine biyoseramik yapının etkisi, doku destek materyalinin hücre kültürü davranışları özellikleri belirlenmiştir. Sentezlenen biyoseramik yapının kemik ve diş yapısında da yeralması, doku mühendisliği uygulamalarında dokunun vücudu kabul etme, vücuda uyum sağlaması gibi avantajları sağlaması özellikleri göz önüne alındığında doku ve organ yetmezliği durumlarına alternatif bir materyal üretimi sağlanmaya çalışılmıştır. Biyoyazıcı ve biyoyazıcı uygulama alanları Şekil 3’de gösterilmektedir.



Şekil 3. (A) Biyoyazıcı ve (B) biyoyazıcı uygulama alanları [7]

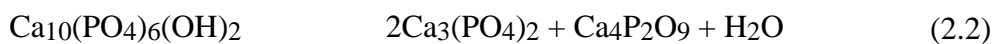
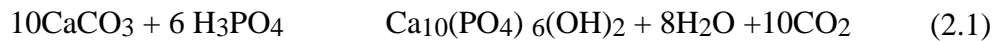
2. Materyal ve Yöntem

2.1. Kullanılan Malzemeler

Doğal kaynaklardan HA biyoseramik eldesi için kum şırlanı (*Donax trunculus*) deniz kabukları İstanbul Eminönü'ndeki deniz ürünleri satışı yapan bir marketten satın alınmıştır. Ortofosforik asit (% 85 saflıkta Merck/Almanya) biyoseramik sentezi sırasında fosfat kaynağı olarak kullanılmıştır. Doku destek materyali üretiminde, molekül ağırlığı 80.000 g/mol PCL (%97 saflıkta Sigma-Aldrich/Türkiye) kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere perasetik asit, etanol, cam petri kapları, insan göbek kordonu kaynaklı 3 milyon mezenkimal kök hücre, tripsin, kollajen ve florasan boya gibi sarf malzemeler İstinye Üniversitesi Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

2.2. Deniz Kabuklarından Biyoseramik Sentezi

Kum şırlanı (*Donax trunculus*) deniz kabukları öncelikli olarak ultrasonik banyoda ve sonrasında fırça ile çeşme suyunda yıkılarak kirliliklerinden arındırılmıştır. Deniz kabukları seramik havanda seramik tokmak yardımı ile öğütülerek 63 µm'lik elekten elenerek standart toz boyutuna getirilmiştir. TGA analizi ile deniz kabuğunun içeriğinde bulunan kalsiyum karbonat (CaCO_3) miktarı belirlenmiştir. Stokiyometrik molar oran HA için $\text{Ca/P} = 10/6$, TCP için $\text{Ca/P} = 3/2$ olarak tespit edilmiştir. Aşağıdaki kimyasal formüller kalsiyum karbonat (CaCO_3) ve fosforik asitten (H_3PO_4) HA üretimini (2.1) ve TCP üretimini (2.2) göstermektedir.



50 ml saf su bir behere alınarak 2 gr deniz kabuğu tozu ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı ile karışıma başlanılmıştır. Vücudun stokiyometrik molar oranına göre deniz kabuğunun yapısındaki CaCO_3 miktarı esas alınarak H_3PO_4 , karışım halindeki çözeltiye damla damla dökülerek $80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 80 MHz güçte 120 dk ile karıştırma işlemi yapılmıştır. Elde edilen çözelti etüvde $100\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 gün bekletilerek sıvı kısmından uzaklaştırılması sağlanmıştır. Oluşan çökeltiler krozelere alınarak amacı doğrultusunda $450\text{ }^\circ\text{C}$ ve $850\text{ }^\circ\text{C}$ 'de sinterleme işlemi uygulanmıştır. Her iki sıcaklık için fırının sıcaklığı dakikada bir $5\text{ }^\circ\text{C}$ artırılarak $450\text{ }^\circ\text{C}$ ve $850\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye getirilerek ısıtma işlemi uygulanmış ve 4 saat sonra kendi halinde soğumaya bırakılmıştır [6]. Şekil 4'de deniz kabuklarından biyoseramik sentezi aşamaları gösterilmektedir.



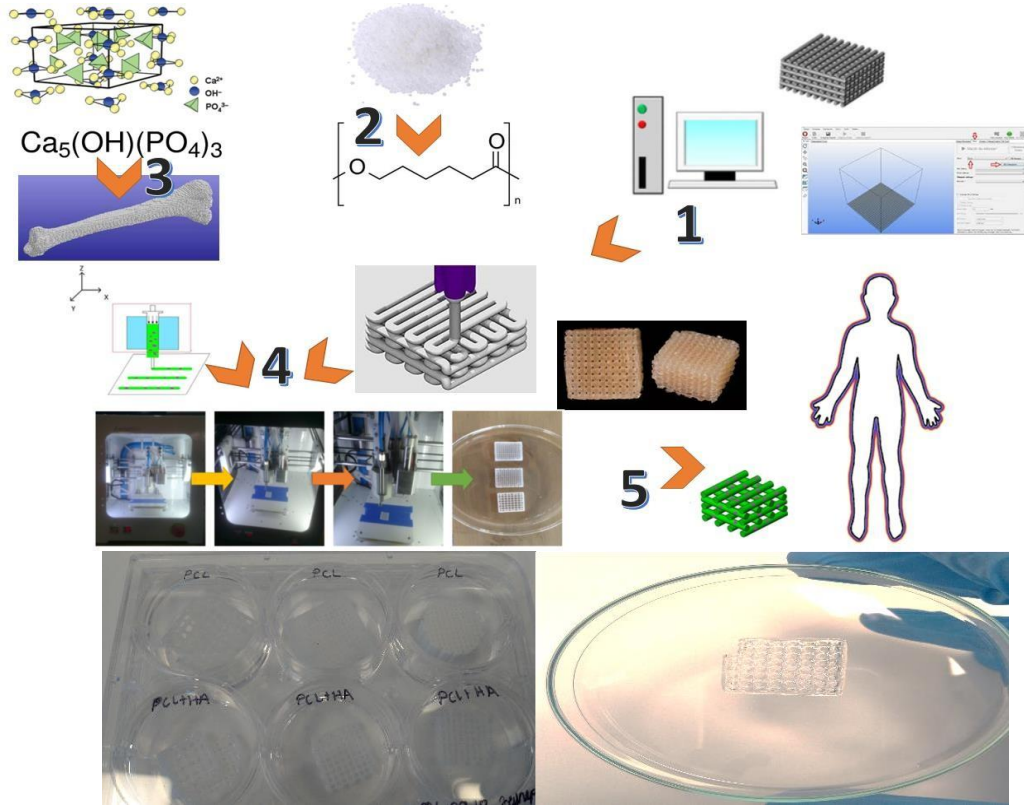
Şekil 4. Deniz kabuklarından biyoseramik sentez aşamaları; 1. *Donax trunculus* deniz kabukları, 2. Ultrasonik banyo ile temizleme işlemi, 3. Deniz kabuklarının fırça ile çeşme suyunda yıkanması, 4. Temizlenen deniz kabuklarının seramik havanda öğütülmesi, 5. Öğütülen deniz kabuklarının elekten elenerek standart toz boyutuna getirilmesi, 6. *Donax trunculus* deniz kabuğuna ait TGA grafiği, CaCO_3 miktarının belirlenmesi, 7. Çözeltinin oluşturulması, 8. Stokiyometrik mol oranına göre H_3PO_4 miktarı hesabı ve damla damla karışmakta olan çözeltilere ilave edilmesi, 9. Oluşan çözeltilerin etüvde kurutulması ve çökeltinin sıvıdan uzaklaştırılması, 10. Çökeltinin 450°C ve 850°C sıcaklıklarında sinterlenmesi işlemi, 11. DKSHA biyoseramik eldesi ve kimyasal bileşimi.

2.3. Biyoyazıcı İle Doku Destek Materyali Üretimi

3 boyutlu katı modelleme programı Solidworks ile doku destek materyalinin tasarımı yapılmıştır. Programdan STL formatı alınarak biyoyazıcının kontrolünün sağlandığı modifiye edilmiş repeater programına aktarılmıştır. Modifiye edilmiş repeater programı üzerinden tasarım açıları, özellikler kısmından tasarıma ilişkin biyoyazıcı bünyesinde yer alan şırınga ve tabla sıcaklık değerleri, doku materyalinin katman sayısı ve hızı, doku materyalinin eni ve boyu özellikleri belirlenmiştir. Doku materyali üretimi için Axolotlbioprinter marka çift şırıngalı ve UV ışını ile kürlleme sistemine olan paslanmaz şırıngaya sahip biyoyazıcı kullanılmıştır. Doku materyali üretimi, Tablo 1'deki değerlere göre paslanmaz şırınga içine 10 gr PCL granülleri doldurulmuştur. Programı üzerinden şırınga ucu, biyoyazıcı baskı hızı değerleri, tabla ve şırınga sıcaklık değerleri girilmiştir. Eriyik haldeki PCL çözeltilisine %1, %5, %8 oranında 63 µm partikül boyutundaki HA takviye edilerek steril bir odada petri kabına baskı alınmıştır [8]. Şekil 5'de biyoyazıcı yardımı ile doku destek materyali üretim aşamaları yer almaktadır.

Tablo 1. Doku destek materyali üretim parametre değerleri [8]

Çözelti konsantrasyonu (ağırlıkça %)		Üretim parametreleri		
PCL	DKSHA	Baskı kafası hareket hızı (mm/s)	Tabaka sıcaklığı (°C)	Şırınga nozul çapı (mm)
10	-	100	45	0.40
10	1	130	47	0.40
10	5	150	55	0.40
10	8	150	55	0.40



Şekil 5. Biyoyazıcı ile doku destek materyali üretim aşamaları; 1. Doku destek materyalinin bilgisayar ortamında tasarlanması, 2. PCL granüllerinin paslanmaz şırınga içine doldurulması ve repeater programı üzerinden ısıtılarak eriyik hale getirilmesi, 3. DKSHA biyoseramiklerinin Tablo 1’de yer alan konsantrasyonlarda eriyik PCL’e takviye edilmesi, 4. Biyoyazıcı ile doku destek materyalinin cam petri kabına basılması, 5. Doku destek materyali görseli

2.4. Sentezlenen Biyoseramik ve Üretilen Doku Destek Materyallerinin Karakterizasyonu

Setaram Labsys marka TGA analiz cihazı ile azot gazı atmosferinde 550 °C sıcaklığa kadar 40 ml/dk boyunca uygulanarak analiz işlemi gerçekleştirildi. DSC analiz cihazı Hitachi 7000X DSC modeldir. Analizde sıcaklık aralığı -80 °C ile 100 °C arasında ve sıcaklık artış hızı da 10 °C/dk olarak belirlendi. Sentezlenen biyoseramiklerinin amorf-kristal yapıları, X-Pert Pro Philips PANalytical marka X-Ray difraksiyon cihazı kullanılarak, X-ışınlarının üretilmesiyle ve dağılım açısı oranı (2θ) 10 °C ve 90 °C arasında 2θ adımlar ile 0.02 °/s ilerleyerek işlem yapıldı. Sentezlenen biyoseramik ve doku destek materyallerinin FTIR analizleri Jasco 6600 model analiz cihazında 400 ile 4400 cm^{-1} dalga boyu aralıklarında yapılarak gerçekleştirildi. 400-4400 cm^{-1} dalga boyu aralığında belirlenen yüzde transmitans (%T) değerlerine bağlı olmakta ve numunelerin yapılarında bulunan bağlar tespit edildi. Tutuculara yerleştirilen biyoseramik ve doku destek materyalleri numuneleri FEI QUNTA FEG 450 SEM mikroskop ile incelendikten sonra fotoğrafları çekildi. Sentezlenen biyoseramik ve üretilen doku destek materyallerinin çap ve boyutlarının incelenmesi sırasında FEGSEM analizleri için 6000x ve 12000x kat oranlarında büyütülmüş görüntüler 7 kV potansiyelde incelendi. Doku destek materyalleri mekanik test cihaz kelepçelerine tutturulmuştur. 500 N yük altında 5 mm^2/dk . çekme hızına, 10 mm çene aralığına ayarlanıp cihazla mekanik özellikler belirlenmiştir. PCL, PCL-%1 DKSHA, PCL-%5 DKSHA ve PCL-%8 DKSHA içeren doku destek materyalleri %4 perasetik asit %96 etanol içeren solüsyonda 15 dakika x 3 kez yıkanarak steril edilmiştir. Ardından iki kez PBS ile yıkanan örnekler UV altında kurumaya bırakılmıştır. Sterilizasyonu tamamlanan örnekler ısı yardımı ile cam petri kaplarının tabanına sabitlenmiştir. İnsan göbek kordonu kaynaklı 3 milyon mezenkimal kök hücre tripsin ile toplanarak santrifüj edilmiştir. Hücreler 1 ml besiyerinde dilüe edildikten sonra besiyeri 1 ml kollajen solüsyonu ile karıştırılmıştır. Karışım doku iskelesindeki porların üzerine bırakılarak hücrelerin porlara yerleşmesi sağlanmıştır. Doku materyalleri son olarak florasan boya ile işaretlenerek florasan mikroskopta görüntülenmiştir [3,9].

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Yapısal Analiz

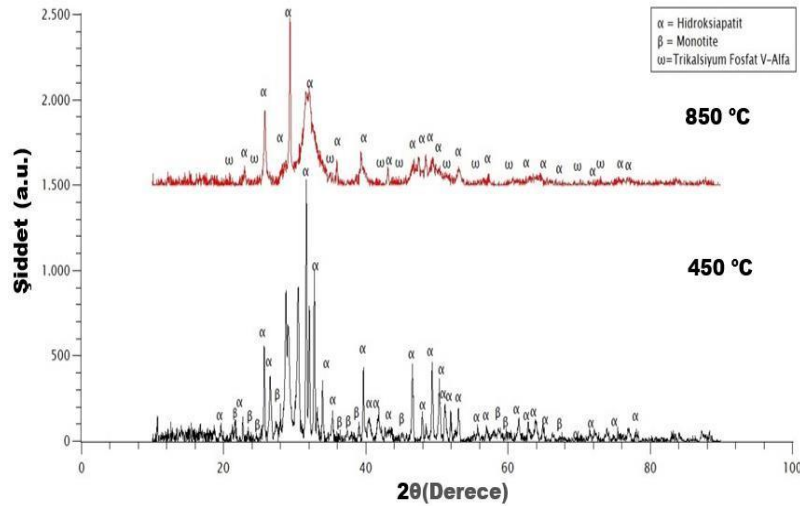
3.1.1. XRD

XRD sonuçları analiz edilmiştir, faz identifikasyonları yapılmıştır. Farklı kristal yapı, formüller ve bileşimlerde, 4 adet farklı kalsiyum fosfat bileşikleri bulunmuştur. Sentezlenen biyoseramiklerin XRD analiz sonuçları Tablo 2’de yer almaktadır.

Tablo 2. Sentezlenen Biyoseramiklerin XRD Analiz Sonuçları

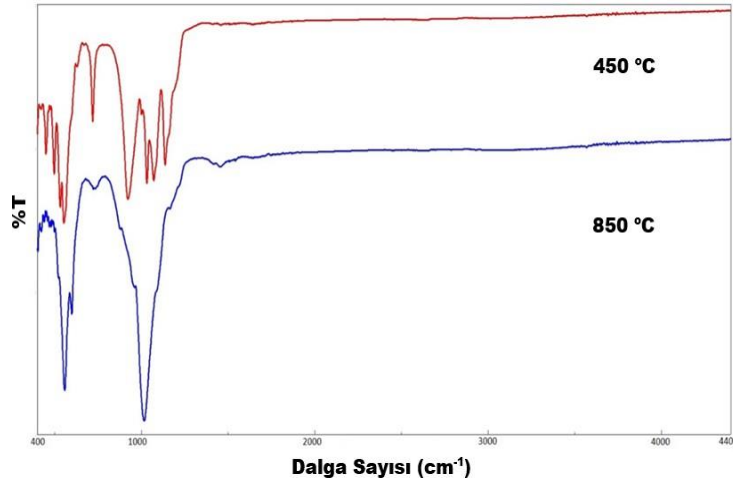
XRD Kristal yapıları	<i>Donax trunculus</i> deniz kabuklarından sentezlenen yapıların sinterleme öncesi ve sonrası değerleri		
	80 °C	450 °C	850 °C
HA ($\text{HCa}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$)	43,8	64,0	97,3
Trikalsiyum bisfosfat ($\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$)	-	-	2,7
Brushite ($\text{H}_5\text{CaO}_6\text{P}$)	56,2	-	-
Monotite (HCaO_4P)	-	36,0	-

Donax trunculus 80 °C sıcaklığında; 98-004-9808 JCPDS kart numaralı HA ($\text{HCa}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$) ve 98-000-4710 JCPDS kart numaralı Brushite ($\text{H}_5\text{CaO}_6\text{P}$) kristal yapıları bulunmaktadır. *Donax trunculus* 450 °C sıcaklığında; 98-008-0526 JCPDS kart numaralı HA ($\text{HCa}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$), 98-000-5561 JCPDS kart numaralı Monotite (HCaO_4P) kristal yapıları yer almaktadır. *Donax trunculus* 850 °C sıcaklığında; 98-005-2692 JCPDS kart numaralı HA ($\text{HCa}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$) ve 98-007-6896 JCPDS kart numaralı Trikalsiyum bisfosfat v-alfa ($\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$) kristal yapıları bulunmaktadır. Bu yapı yüksek miktarda biyoyoumluluğu sahiptir ve kemik yapımızda benzerliği olduğundan kemik ve diş dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır [3]. Şekil 6’da *Donax trunculus* kabuklarından sentezlenen biyoseramiklerin 450 °C ve 850 °C’deki sinterlenmiş HA kristal yapısı yer almaktadır.



Şekil 6. *Donax trunculus* kabuklarından sentezlenen biyoseramiklerin 450 °C ve 850 °C’deki sinterlenmiş HA kristal yapısı

3.1.2. FTIR



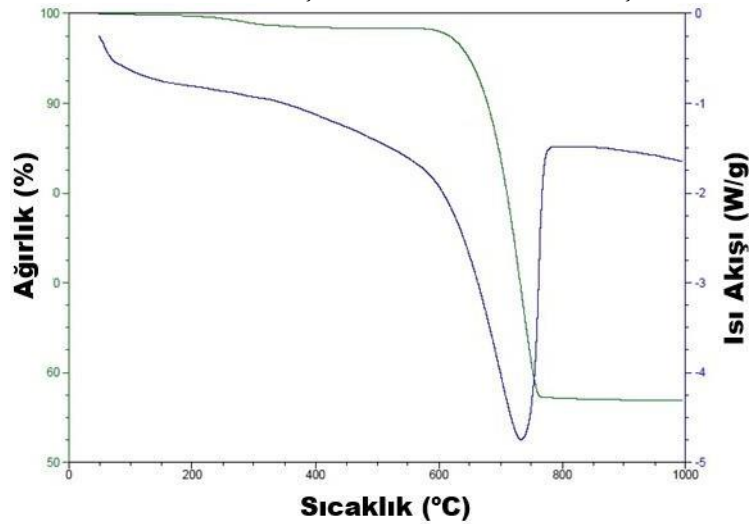
Şekil 7. *Donax trunculus* deniz kabuklarından elde edilen, 450°C ve 850°C’de sinterlenmiş biyoseramiklerin FTIR spektrumları

450 °C ve 850 °C’de sinterlenmiş *Donax trunculus* deniz kabuklarından sentezlenen biyoseramik FTIR spektrumları Şekil 7’de yer almaktadır. 450 °C sinterlenmiş biyoseramik FTIR spektrumu incelendiğinde PO_4^{3-} titreşimlerine karşılık gelen pikler; 449.33, 552.50, 718.35, 921.80, 1031.70, 1070.30 ve 1136.83 cm^{-1} frekanslarında şiddetli pikler bulunurken, 421.37, 473.43, 669.17 ve 999.91 cm^{-1} frekanslarında zayıf pikler halinde gözlemlenmiştir. CO_3^{2-} titreşim bantları 1457.92 ve 1647.88 cm^{-1} ’de zayıf pikler şeklinde olduğu tespit edilmiştir. 850 °C’de sinterlenmiş biyoseramik FTIR spektrumu incelendiğinde 450 °C sinterlenmiş biyoseramik FTIR spektrumuna ek olarak; 557.32, 597.82 ve 1026.40 cm^{-1} ’de şiddetli PO_4^{3-} pikleri, 526.47, 875.52, 962.30, 1083.80 ve 1164.79 cm^{-1} ’de zayıf PO_4^{3-} pikleri ve 1451.17 cm^{-1} ’de CO_3^{2-} titreşim bandı tespit edilmiştir [10].

3.2. Termal Analiz

3.2.1. TGA

Kalsiyum ve fosfat kaynağı olan *Donax trunculus* kullanılarak, kimyasal çöktürme yöntemi ile HA ve TCP üretimi için gerekli H_3PO_4 oranları belirlenmiştir. Biyoseramiklerin hazırlanmasında kalsiyum kaynağı olarak $CaCO_3$, fosfat kaynağı olarak da H_3PO_4 kullanılmıştır. HA için Ca/P: 10/6, β -TCP için Ca/P: 3/2 stokiometrik molar oranı ile kimyasal reaksiyon için gerekli H_3PO_4 miktarı hesaplanmıştır. 2 gr tartılmıştır ve Ca mol miktarı hesaplanmıştır. Şekil 8’de *Donax trunculus* deniz kabuğuna ait TGA grafiği yer almaktadır. Tablo 3’de TGA sonuçları ve ham malzemenin Ca içerikleri bulunmaktadır.



Şekil 8. *Donax trunculus* deniz kabuğuna ait TGA grafiği

Tablo 3. TGA Sonuçları ve Ham Malzemenin Ca İçerikleri

Hammadde	% Kütle azalması	% CaO miktarı	2 gr da CaO mol miktarı
<i>Donax trunculus</i>	54,5	45,5	0.02785

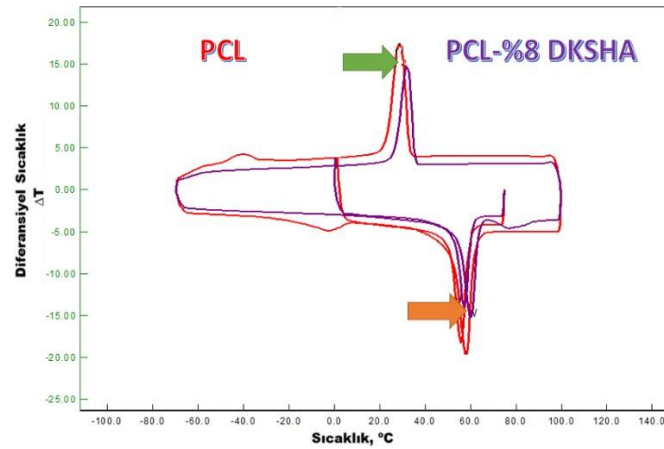
Çalışmada %85'lik H₃PO₄ konsantre (yoğunluğu 1.71) kullanılmıştır. HA için Ca/P: 10/6, TCP için Ca/P: 3/2 stokiyometrik molar oranı ile asit çözeltisinin reaksiyon için gerekli hacmi hesaplanmıştır. Tablo 4'de biyoseramiklerin sentezinde kullanılan H₃PO₄ miktarı yer almaktadır.

Tablo 4. Biyoseramiklerin Sentezinde Kullanılan H₃PO₄ Miktarı

Numune	HA(Ca:P = 10:6)		TCP (Ca:P = 3:2)	
	P mol miktarı	H ₃ PO ₄ µl/2gr	P mol miktarı	H ₃ PO ₄ µl/2gr
<i>Donax trunculus</i>	0.01772	1188µl	0.011935	1293 µl

3.2.2. DSC

Doku destek materyallerinin termal analizleri -80 °C ile 110 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dk ısıtma hızında azot gazı altında gerçekleştirilmiştir. İşlem ısıtma-soğutma-ısıtma olacak şekilde 3 adımda gerçekleştirilmiştir. Şekil 8 ve Tablo 5'deki değerler ışığında PCL'e nazaran T_c, T_e ve T_k değerleri artmıştır. Bu sıcaklık artışı doku destek materyalinin termal özelliklerinin arttığını desteklemektedir. DKSHA takviye miktarı doku destek materyalinde arttıkça termal özelliklerinin arttığı amorf bir yapıdan daha kristal bir yapı haline geldiği tespit edilmiştir [11]. Şekil 9'da doku destek materyallerinin DSC analiz spektrumu ve Tablo 5'de doku destek materyallerinin T_c, T_e ve T_k analiz değerleri bulunmaktadır.



Şekil 9. Doku destek materyallerin DSC analiz spektrumu

Tablo 5. Doku destek materyallerinin T_c, T_e ve T_k analiz değerleri

	T _c (°C)	T _e (°C)	T _k (°C)
PCL	-68.6	57.9	28.8
PCL-%8 DKSHA	-67.5	59.8	31.28

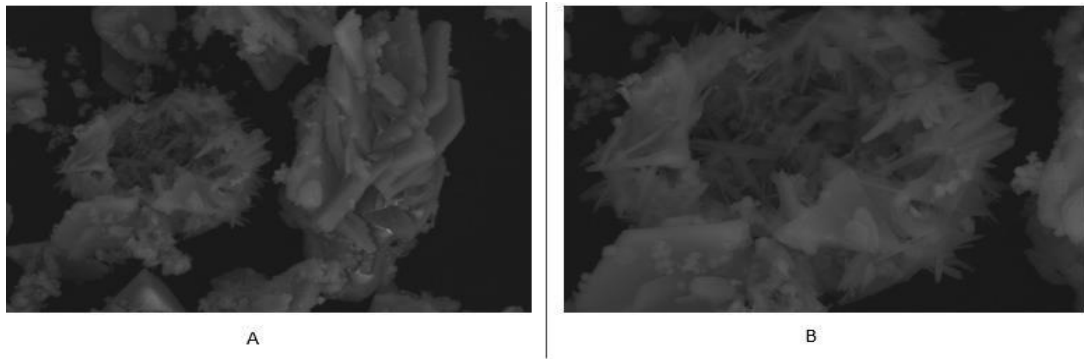
T_c: Camı geçiş sıcaklığı
T_e: Erime noktası
T_k: Kristalizasyon derecesi

3.3. Morfolojik Analiz

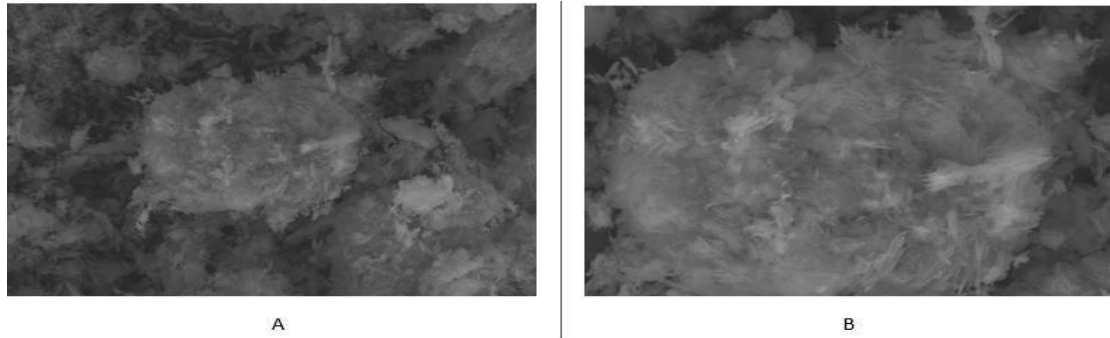
3.3.1. FEGSEM

3.3.1.1. Biyoseramik malzemelerin FEGSEM analizi

Donax trunculus deniz kabuklarından sentezlenen biyoseramiklerin 450 °C ve 850 °C sıcaklıklarındaki sinterlenmiş farklı büyütmelelerdeki (6000x, 12000x) FEGSEM görüntüleri Şekil 10 ve Şekil 11’de yer almaktadır. *Donax trunculus* deniz kabuklarından sentezlenen 450 °C’de sinterlenmiş biyoseramiğin yapısında kalın plaka halinde kristallerinin yanı sıra iğnemsî whisker tipi kristaller de görülmektedir. İğne kristallerin boyutları 1-20 µm arasındadır. Buna karşılık boyutları 20 mikrondan daha büyük plaka halinde yapılar bulunmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda sinterlemenin *Donax trunculus* nano yapıların oran ve inceliğini arttırdığı tespit edilmiştir. 450 °C’de ve 850 °C’de sinterlenmiş biyoseramik yapıları incelendiğinde büyük yapısal bir değişim olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca oluşan bu partiküllerin ortalama çapları 80 nm olduğu belirlenmiştir. Plaka tipi yapıların iyi kristallenmiş halde olduğu yapılan XRD analizleri ile doğrulanmıştır. 850 °C’de sinterlenmiş biyoseramik yapısı incelendiğinde farklı boyutlara sahip partiküllerin olduğu tespit edilmiştir. Bu partiküllerin ortalama çapları 94 nm olduğu tespit edilmiştir. Sinterleme sıcaklığının artması ile plaka tipi yapıların değişerek küçük parçacıklar şeklinde iğnemsî bir hal aldığı gözlemlenmiştir [3].



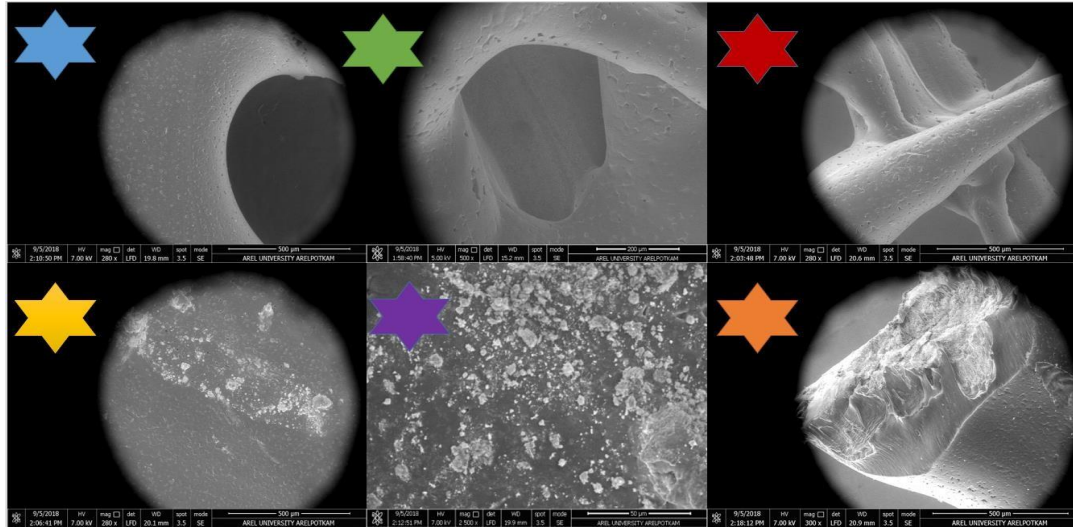
Şekil 10. 450 °C sinterlenen *Donax trunculus* deniz kabuğundan sentezlenen biyoseramiklerin FEGSEM görüntüleri; (A): 6000x, (B): 12000x



Şekil 11. 850 °C sinterlenen *Donax trunculus* deniz kabuğundan sentezlenen biyoseramiklerin FEGSEM görüntüleri; (A): 6000x, (B): 12000x

3.3.1.2. Doku destek materyallerinin FEGSEM analizi

PCL, PCL-%1 DKSHA, PCL-%5 DKSHA ve PCL-%8 DKSHA doku destek materyallerinin FEGSEM morfolojik görüntüleri Şekil 12’de gösterilmektedir. PCL yapısı üzerinde irili ufaklı birçok çukur gözlemlenmiştir. Bu çukur yapılar hücre kültürü davranışı çalışmalarında hücre büyümesini artırıcı yüzey aktivitesi özelliği sergilemektedir. PCL matrisine %1, %5 ve %8 oranında DKSHA takviyesi ile doku destek materyalinin morfolojisi üzerinde DKSHA inorganik biyoseramik yapının yer aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca PCL-%8 DKSHA doku destek materyali kesiti incelendiğinde fibrillerinin uzunlaşmasına yönlendiği ve DKSHA biyoseramiğinin doku destek materyalinin yüzeyini kapladığı gözlemlenmiştir [3,12]. Şekil 12’de doku destek materyallerinin FEGSEM morfolojik görüntüleri yer almaktadır.

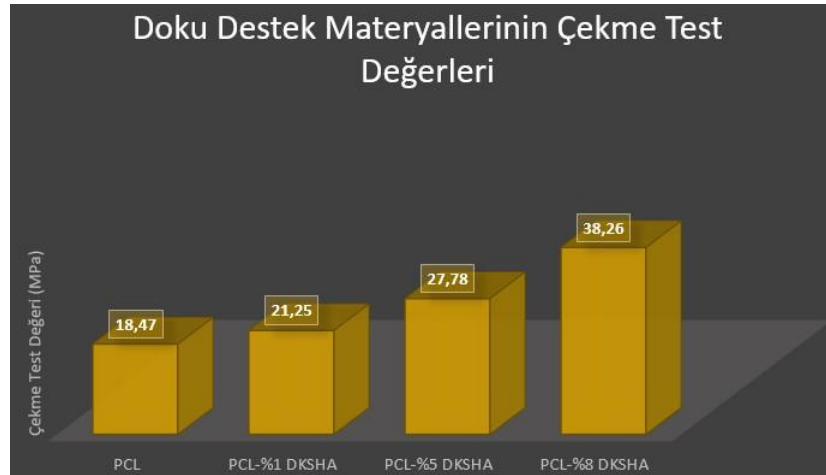


Şekil 12. Doku destek materyallerinin FEGSEM morfolojik görüntüleri

3.4. Mekanik Analiz

3.4.1. Çekme testi

PCL, PCL-%1 DKSHA, PCL-%5 DKSHA ve PCL-%8 DKSHA doku destek materyallerinin çekme testleri gerçekleştirilmiş ve Şekil 13’de doku destek materyallerinin çekme test değerleri yer almaktadır. Gerçekleştirilen çekme test değerleri incelendiğinde PCL-%8 DKSHA doku destek materyali çalışmadaki en yüksek değere sahip olduğu tespit edilmiştir. DKSHA takviye miktarı arttıkça doku destek materyalinin mukavemet özellikleri de doğrusal olarak artmıştır. Bu mukavemet artışı hem yük taşıma kapasitesi yüksek polimerik (PC) matrisin, hem nanobiyoseramik katkının hem de doku materyalinde homojen dağılımın bir sonucudur [3, 13].

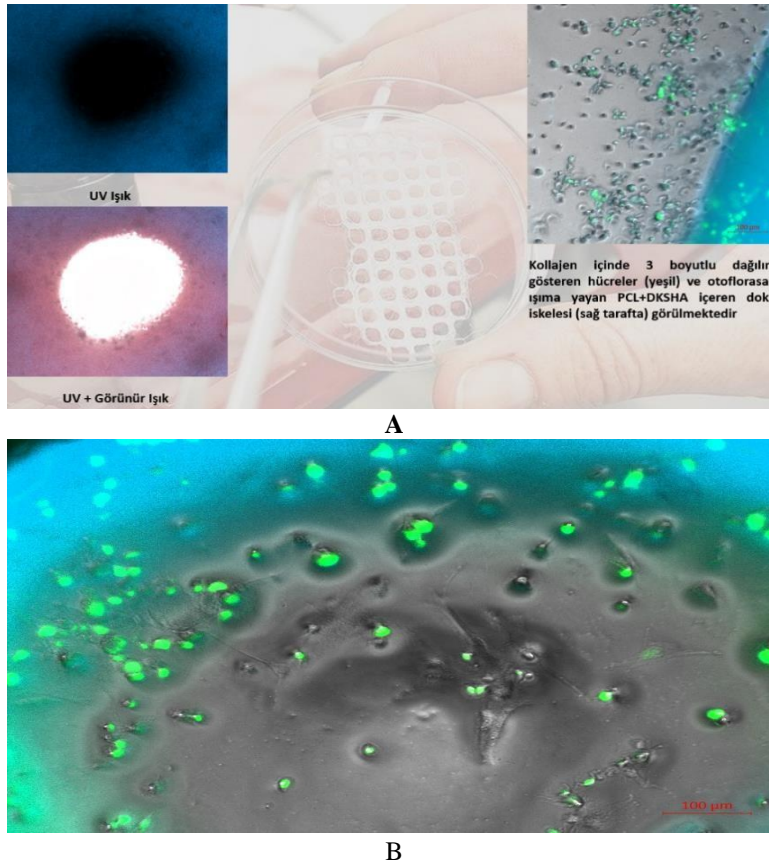


Şekil 13. Doku destek materyallerinin çekme test değerleri

3.5. Biyolojik Analiz

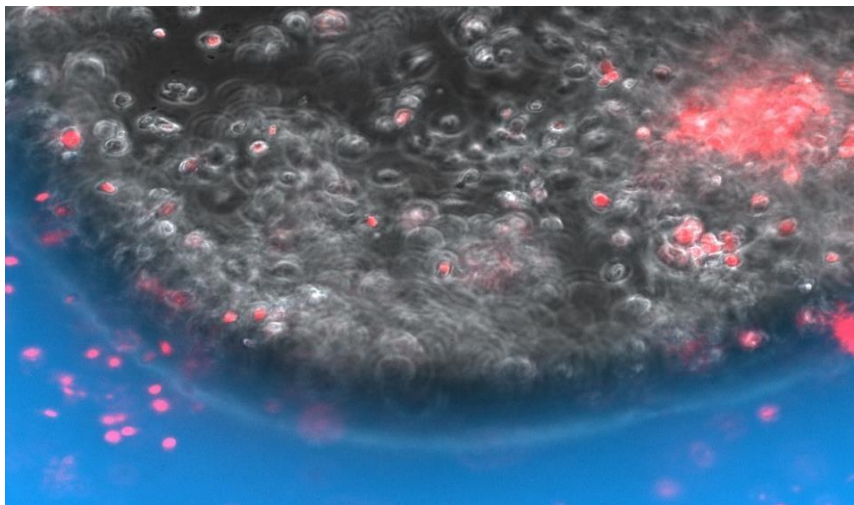
3.5.1. Hücre kültürü

PCL, PCL-%1 DKSHA, PCL-%5 DKSHA ve PCL-%8 DKSHA doku destek materyallerinin hücre davranışları incelendiğinde; PCL içeren numuneler UV ışına maruz bırakıldığında mavi tonda hafif otoflorasan özellikte olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelerin, kültüre edildikleri 24 saatlik sürenin ardından kollajen içerisindeki şekillerini korudukları belirlenmiştir. Bir kısım hücrenin ise porların kenar kısımlarından PCL numunesine tutundukları tespit edilmiştir. Por içerisinde bir kısmı tabana bir kısmı porun kenarlarına tutunmuş, bir kısmı ise kollajen içinde 3 boyutlu yerleşimini koruyan mezenkimal kök hücreler (yeşil) ve otoflorasan ışına yayan PCL-DKSHA içeren doku iskelesi (periferde) yer almaktadır. Şekil 14’de UV ışına maruz bırakılmış doku destek materyallerinin kollajen içinde hücre yapısı ve otoflorasan ışına yayan PCL-DKSHA içeren doku iskelesi gösterilmektedir.



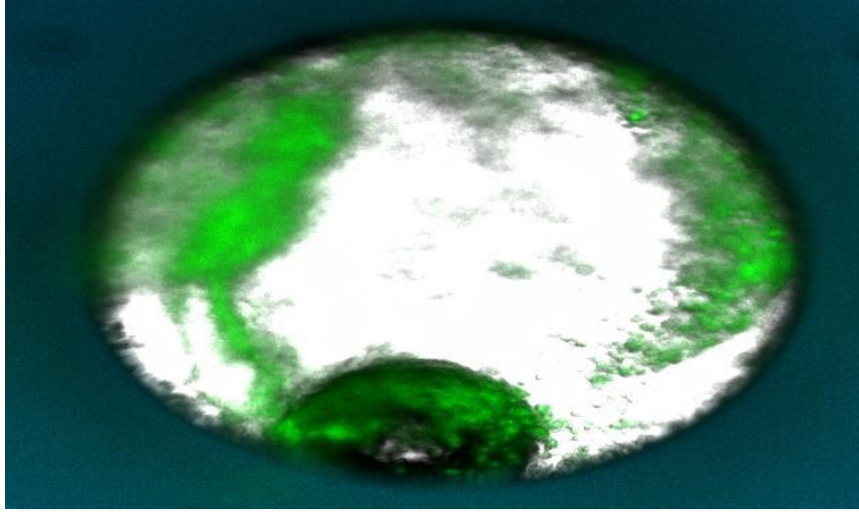
Şekil 14. (A) UV ışına maruz bırakılmış doku destek materyallerinin kollajen içinde hücre yapısı, (B) 3 boyutlu yerleşimini koruyan mezenkimal kök hücreler (yeşil) ve otoflorosan ışımaya yayın PCL-DKSHA içeren doku destek materyali görüntüsü

PCL-DKSHA içeren por çapı daha geniş diğer bir doku destek materyali içerisinde çok sayıda hücrenin kollajen içerisinde yaşamaya devam ettiği gözlemlenmiştir. Canlı hücre oranı (boyanmamışlar) ölü hücelere oranla (kırmızı) oldukça yüksek olduğu ve canlı hücre oranı en yüksek PCL-%8 DKSHA doku materyalinde olduğu belirlenmiştir. Şekil 15’de PCL-DKSHA içeren por çapı daha geniş diğer bir doku destek materyali içerisinde bulunan canlı (boyanmamışlar) ve ölü hücreler (kırmızı) gösterilmektedir.



Şekil 15. PCL-DKSHA içeren por çapı daha geniş diğer bir doku destek materyali içerisinde bulunan canlı (boyanmamışlar) ve ölü hücreler (kırmızı)

Sadece PCL içeren bir diğer doku destek materyalinin poru içerisinde işaretli çok sayıda hücrenin (yeşil) kollajen ile birlikte porun çeperine tutunduğu gözlemlenmiştir. Alt kısımdaki hücreler bir hava kabarcığı çevresine yerleşmiş durumda bulunmaktadır. Bu durum hücrelerin oksijen almak için doku materyali içerisinde uygun bölgeleri tercih ettiğini işaret etmektedir. Bu hava kabarcığı çevresine yerleşmiş hücreler PCL'e takviye edilen DKSHA biyoseramiği oranının artması ile daha da çoğalmıştır. Hem kullanılan biyopolimerin hem de takviye edilen biyoseramiğin bir etkisi olduğu tespit edilmiştir [3, 6, 14]. Doku destek materyali por çeperlerine kollajen ile hücrelerin tutunma görüntüsü Şekil 16'da bulunmaktadır.



Şekil 16. Doku destek materyali por çeperlerine kollajen ile hücrelerin tutunma görüntüsü

4. Sonuçlar

Kimyasal çöktürme yöntemiyle *Donax trunculus* deniz kabuklarından HA ve diğer kristal yapılar sentezlenmiştir. Bu yapılar bifazik özellikler sergilemektedir, HA ve TCP yapılarına göre daha biyouyumlu ve kontrollü biyolojik bozunabilirlik etkileri sağlayabilmektedirler. Biyoyazıcı sistemi ile doku mühendisliğine yönelik doku destek materyalleri oluşturulmuştur. Sentezlenen biyoseramiklerin yüksek miktarda DKSHA içerdiği ve DKSHA oranının artması ile birlikte doku destek materyalinin termal, mekanik ve biyolojik özelliklerinin de arttığı belirlenmiştir. Hücre kültürü davranışları esas alındığında doku destek materyallerinin hücre uyumluluğunu arttırdığı belirlenmiştir. Biyoyazıcı ile basılmış PCL-%8 DKSHA doku destek materyalinden diğer numunelere göre daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. DKSHA takviyesi ile PCL matris yapılarının insan kök hücreleri için destek materyali olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir. Çalışmanın devamı olarak, canlı hücrelerin doğrudan hassas konumlandırılmasıyla geleneksel yöntemlerle hedef dokunun oluşturulması sırasında meydana gelen zaman ve maddi kayıplar önlenecektir. Ayrıca transplantasyon sonrası malzeme kaynaklı uyumsuzluğun tamamen ortadan kaldırılmasına imkan sağlanacaktır.

Teşekkür

Biyoseramik sentezi, biyoseramik ve doku destek materyalinin karakterizasyonunda İstanbul Arel Üniversitesi ArelPOTKAM (Polimer Teknolojiler ve Kompozit Uygulama ve Araştırma Merkezi), Doku destek materyali üretiminde Axolotl Biyosistemler San. ve Tic. Ltd. Şti. firması, Doku destek materyallerinin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde Zwick/Roell Zwick Avrasya Ltd. firması, *Donax trunculus* deniz kabuklarının TGA ve sentezlenen biyoseramiklerin XRD analizlerinde İstanbul Teknik Üniversitesi Prof. Dr. Adnan Tekin Malzeme Bilimleri ve Üretim Teknolojileri Uygulama Araştırma Merkezi ve Hücre kültürü çalışmalarında İstinye Üniversitesi Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı çalışanlarına desteklerinden ötürü teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- [1] Tarafder, S., & Bose, S. (2014). Polycaprolactone-coated 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering: in vitro alendronate release behavior and local delivery effect on in vivo osteogenesis. *ACS applied materials & interfaces*, 6(13), 9955-9965.
- [2] Aydın, M., Yıldırım, F., & Çantı, E. (2018). Farklı Yazdırma Parametrelerinde Pla Filamentin İşlem Performansının İncelenmesi. *Technologies And Digital Industry (3d-Pic2018) Scientific Program*, 160.
- [3] Buluş, E. (2017). Doğal izole edilmiş biyoseramiklerden elektrospinning yöntemi ile polimerik biyokompozit malzeme eldesi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Elazığ.
- [4] Çalış, M. (2013). β östradiolün Kitosan-hidroksiapatit Yapıdaki Doku İskelesine Yüklenen Yağ Dokusundan Türetilmiş Mezekimal Kök Hücreler Üzerindeki Osteojenik Etkisinin Deneysel Kemik Defekti Modelinde Araştırılması.
- [5] Köymen Çağar, P. (2009). Co bazlı implant malzemeler üzerine HAP filmlerinin üretilmesi ve fiziksel ve mekaniksel özelliklerinin incelenmesi (Doctoral dissertation, DEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [6] Bulus, E., Ismik, D., Mansuroglu, D. S., Sahin, Y. M., & Tosun, G. (2017). Synthesis and characterization of hydroxyapatite powders from eggshell for functional biomedical application. In *Electric Electronics, Computer Science, Biomedical Engineerings' Meeting (EBBT)*, pp. 1-3.
- [7] Mironov, V., Kasyanov, V., & Markwald, R. R. (2011). Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line. *Current opinion in biotechnology*, 22(5), 667-673.
- [8] Gu, B. K., Choi, D. J., Park, S. J., Kim, M. S., Kang, C. M., & Kim, C. H. (2016). 3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications. *Biomaterials research*, 20(1), 12.
- [9] Bártolo, P. J., Chua, C. K., Almeida, H. A., Chou, S. M., & Lim, A. S. C. (2009). Biomanufacturing for tissue engineering: present and future trends. *Virtual and Physical Prototyping*, 4(4), 203-216.
- [10] Meejoo, S., Maneeprakorn, W., & Winotai, P. (2006). Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating. *Thermochimica Acta*, no. 447, p. 115-120.
- [11] Nyberg, E., Rindone, A., Dorafshar, A., & Grayson, W. L. (2017). Comparison of 3D-printed poly- ϵ -caprolactone scaffolds functionalized with tricalcium phosphate, hydroxyapatite, bio-oss, or decellularized bone matrix. *Tissue Engineering Part A*, 23(11-12), 503-514.
- [12] Endres, M., Hutmacher, D. W., Salgado, A. J., Kaps, C., Ringe, J., Reis, R. L., ... & Schantz, J. T. (2003). Osteogenic induction of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in novel synthetic polymer-hydrogel matrices. *Tissue Engineering*, 9(4), 689-702.
- [13] Becker, J., Lu, L., Runge, M. B., Zeng, H., Yaszemski, M. J., & Dadsetan, M. (2015). Nanocomposite bone scaffolds based on biodegradable polymers and hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(8), 2549-2557.
- [14] Şahin, Y. M. (2019). Synthesis of an Antimicrobial Thioanthraquinone Compound to Produce Biodegradable Electrospun Mats for Tissue Engineering Purposes. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 5(3), 1119-1134.