

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.gov.tr/ejbcs



3D composite scaffold production using Cu doped bioglass and Sr doped bioglass with Cu nanoparticles

Ayşe Özyuğuran^{1*}, Melek Erol Taygun¹, Sadriye Küçükbayrak¹

¹Istanbul Technical University, Chemical&Metallurgical Engineering Faculty, Chemical Engineering Department, Istanbul, Turkey

*Corresponding author : kmayse@itu.edu.tr
Orcid No: 0000-0002-9149-4004.

Abstract: In this study, it was aimed to produce BG/polymer 3D composite scaffolds with relevant ions in order to develop multifunctional scaffolds by using salt template-particulate leaching technique. The porous scaffolds were successfully synthesized and it was observed that there was a good pore interconnectivity maintained in the scaffold microstructure. In vitro bioactivity of the composite scaffolds was confirmed by Scanning Electron Microscopy, X-ray diffraction and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy measurements. Furthermore, the release of therapeutic ions were determined as a function of immersion time in SBF, while the Sr ion release is in the range of 1.27-4.81 ppm, the Cu ion releases are 0.67-1.42 ppm for Cu doped BG, 1.53-4.54 ppm for Sr doped BG- 1% Cu, and 3.08-7.59 ppm for Sr doped BG- 2% Cu, respectively. This result indicated that the scaffolds can deliver controlled doses of strontium and copper toward the SBF medium that is the determinant for bone tissue regeneration.

Keywords: Composite scaffold, bioactive glass, therapeutic ions, bone tissue engineering

Cu katkılı biyocam ve Cu nanoparçacıklı Sr katkılı biyocamdan 3D kompozit yapı iskelesi üretimi

Özet: Bu çalışmada, çözücü döküm ve tanecik uzaklaştırma yöntemi kullanılarak, çok işlevli yapı iskelelerinin geliştirilmesi için ilgili iyonlarla BG / polimer 3D kompozit yapı iskelelerinin üretilmesi amaçlanmıştır. Gözenekli yapıya sahip yapı iskeleleri başarıyla sentezlenmiş ve yapı iskelelerinin mikroyapısında iyi bir gözenek bağlantısının bulunduğu gözlemlenmiştir. Kompozit yapı iskelelerinin in vitro biyoaktivitesi; Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), X-ışını kırınımı ve Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi ölçümleri ile teyit edilmiştir. Bunun dışında, terapötik iyonların salımının; SBF'de kalma sürelerinin bir fonksiyonu olarak, Sr iyon salımı 1.27-4.81 ppm aralığında iken, Cu iyon salımları sırasıyla, Cu katkılı BG için 0.67-1.42 ppm, Sr katkılı BG-%1 Cu için 1.53-4.54 ppm, Sr katkılı BG-%2 Cu için 3.08-7.59 ppm olarak saptanmıştır. Bu sonuç yapı iskelelerinin, kemik dokusu rejenerasyonunun belirleyicisi olan SBF ortamına, stronsiyum ve bakır dozlarını kontrollü olarak verebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kompozit yapı iskelesi, biyoaktif cam, terapötik iyonlar, kemik doku mühendisliği

© EJBACS. All rights reserved.

1. Giriş

Yaşlanan nüfusun artmasıyla, insan yaşamının kalitesinde önemli rol oynayan ve kemik kusurlarına yol açan dejeneratif hastalıklara ve travmatik yaralanmalara daha sık rastlanmaktadır. Çözümlerden biri kemik naklidir, fakat uygun donörün bulunamaması en önemli problemlerden biridir. Biyo inert malzemelerin kullanımı ile gerçekleştirilen implantasyon işlemi, kemik yoğunluğunda azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca, kullanılan bu malzemelerin belli sürelerle değiştirilmesi gerekmektedir (Correlo ve ark., 2011). Kemik dokusu mühendisliği, yaralı kemik dokularını biyolojik olarak bozunabilir yapı iskelesi yardımıyla onarmak, değiştirmek ya da yenilemek amacıyla hızla gelişen bir disiplindir. Bu yaklaşımın avantajı,

hastanın iyileşmesi için yapılması gerekli operasyon sayısının azalması, dolayısıyla da hastanın iyileşme süresinin kısalmasıdır (Correlo ve ark. 2011, Wang ve Yeung, 2017).

Mükemmel bir yapı iskelesi üretmek, doku mühendisliğinin en zor aşamasıdır. Genel olarak, tek bir malzemenin özelliklerinin yetersiz olduğu durumlarda, iki veya daha fazla malzemenin özelliklerini birleştirerek, yeterli mekanik ve / veya kimyasal özelliklere sahip malzemeleri elde etmek yaygın şekilde uygulanan bir tekniktir (Chen ve ark., 2008a). Doğal kemik matrisi, biyolojik seramik ve biyolojik polimerin bir bileşimidir. Bu nedenle, kemik dokusu mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere, biyoaktif camlar (BG) ve biyo-emilir polimerlerin kombinasyonu ile

istenilen fiziksel, biyolojik ve mekanik özelliklere sahip bir yapı iskelesi üretmek oldukça mantıklıdır (Chen ve ark., 2008a, Kaur ve ark., 2014). Yapı iskelesi üretim malzemeleri arasında yer alan biyoaktif camlar, biyoyumlu, osteoconductive ve osteoproduktif oldukları için kemik dokusu rejenerasyonu için mükemmel performans sergilemektedir (Gerdhardt ve Boccacini, 2010). Biyoaktif camlar insan vücuduna implante edildiğinde veya biyolojik sıvılarla temas ettiğinde, içeriklerinde bulunan Si, Ca, P ve Na iyonları ara yüzeylerde çözünürler ve hücre içi ile hücre dışında uygun tepkilere girerek hızlı kemik oluşumuna neden olurlar (Öztopalan ve Durmuş, 2017). Böylece biyoaktif cam yüzeyinde bir karbonatlı hidroksiapatit (HCA) tabakası oluşturulurlar. Bu HCA tabakası, biyoaktif camın gerçek kemik yapısına kimyasal olarak bağlanmasını sağlar (Chen ve ark., 2008a; Kaur ve ark., 2014; Rezwan ve ark., 2006).

Son yıllarda, biyo-polimerlerin ve biyoaktif camların kombine edilmesi ile, geçici ortopedik implantlar, kemik dolgu malzemeleri veya doku mühendisliği alanında üç boyutlu (3D) biyoyumlu yapı iskeleleri gibi uygulamalar için yeni bir kompozit malzeme grubu ortaya çıkmıştır (Rezwan ve ark., 2006). Bu kompozit malzemelerin kemik üretim özelliklerini iyileştirmek için, kemik hücre uyarıcı iyonları (Sr, Cu, Ag, v.b) kompozit malzemenin kimyasal bileşimine dahil etmek çok uygulanan bir yöntemdir. Stronsiyumun kemik iyileştirme süreçlerini hızlandırdığı ve kemik dokusu onarımı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Chen ve ark., 2008b). In vitro ve in vivo çalışmalar, stronsiyumun kemik oluşumunu artırdığını ve osteoprozu azalttığını ve hayvanlar ile insanlarda kemiğin kütlelerinde ve kemiğin mekanik özelliklerinde bir artışa neden olduğunu göstermiştir (Seeman ve ark., 2008). Bakır iyonları, anjiyojenezin uyarılmasında aktif bir rol oynamaktadır (Wang ve ark., 2014). Erol ve ark. (2012a), bor içeren biyoaktif cam kullanarak yeni yapı iskeleleri oluşturmuşlar ve bakır iyonlarıyla çapraz bağlanmış alginat ile kaplamışlardır. Bakır salınım çalışmaları, yeni yapı iskelelerinden bakır iyonlarının kontrollü bir şekilde serbest bırakıldığını ve dolayısıyla bu etkinin, kemik rejenerasyonu için anjiyojenik potansiyel olarak yararlı olabileceğini göstermiştir (Erol ve ark., 2012a).

Bu çalışmada, büyük kemik defektlerini onarmak için çoklu kullanıma uygun, biyoaktif cam kaynaklı, çok fonksiyonlu 3D kompozit yapı iskelelerinin elde edilmesi araştırılmıştır. Bu amaçla, 3D biyoaktif cam-polilaktid (PDLLA) kompozit gözenekli yapı iskeleleri, çözücü döküm ve tanecik uzaklaştırma yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Üretilen yapı iskelelerinin mikroyapısal, fiziksel ve biyoaktivite özellikleri farklı karakterizasyon yöntemleri uygulanarak belirlenmiştir.

2. Materyal ve Metod

Yapı iskelesi üretiminde kullanılan rasemik poli (D, L-laktit) (PDLLA) granülleri (75,000-120,000 mol ağırlığı) Sigma-Aldrich Ltd. (ABD) 'den temin edilmiştir. Çözücü olarak, susuz dimetil karbonat (DMC, Merck) kullanılmıştır. Bu çalışmada yapı iskelelerinin üretiminde

kullanılan stronsiyum ve bakır içeren biyoaktif cam tozları başka bir çalışmamızda üretilmiştir (Erol ve ark., 2012b). Bu camların ağırlıkça yüzde bileşimi, %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %22.5 CaO ve %2 Sr ve %2 Cu'dan oluşmaktadır. Biyoaktif cam (BG), seramik bilyalı değirmende tanecik boyutu ≤45 µm olacak şekilde öğütülmüştür. Kullanılan diğer tüm kimyasalların analitik saflıkta olmasına dikkat edilmiştir.

Cu nanoparçacıkları, CuSO₄'tan üretilmiştir. Deiyonize su ile seyreltilmiş CuSO₄ çözeltisinin pH'ı, amonyak eklenerek 10'a ayarlanmıştır. 100 mL aljinat çözeltisi üzerine, hazırlanan CuSO₄ çözeltisi yavaşça ilave edilmiştir. Çözeltiler birbirine tamamen karıştıktan sonra, Cu iyonlarını indirmek için, hidrazin ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti, mikrodalga fırında 2 dakika ısıtılmıştır. Bu işlemin ardından Cu partiküllerini elde etmek için, çözelti üç kez 22000 rpm'de 40 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüjlemeden sonra Cu parçacıkları distile su ile yıkanmış ve tamamen kurumalarını sağlamak için vakum etüvünde gece boyunca bekletilmiştir.

Yapı iskeleleri, yemeklik tuz taneleri kullanılarak çözücü döküm ve tanecik uzaklaştırma yöntemi (Misra ve ark., 2010) uygulanarak hazırlanmıştır. PDLLA pelletleri, çözelti konsantrasyonları %8 w/v ve %4 w/v olacak şekilde DMC'de çözülmüştür. Bakır nanoparçacıklarının kullanıldığı üretimde, nanoparçacıklar polimer ağırlığının %1'i ve %2'si olacak şekilde çözeltilere ilave edilmiştir. Bakır nanoparçacıkların ilavesinden sonra, parçacıkların tamamen dağılmasını sağlamak için, süspansiyonlar iyice karıştırılmıştır. Daha sonra, süspansiyonların bileşimlerinde %20 Sr olacak şekilde uygun miktarda BG eklenmiştir. Bakır katkılı biyocamın kullanıldığı üretimde ise, %8 w/v ve %4 w/v konsantrasyonlarında hazırlanmış olan PDLLA çözeltilerine bileşimlerinde %20 Cu olacak şekilde uygun miktarda bu kez bakır katkılı biyocam ilave edilmiştir. Parçacıkların dağılımının tamamlanması ve topaklanmanın önlenmesi için süspansiyonlar ultrasonik su banyosu kullanılarak karıştırılmıştır. Böylece, PDLLA-BG-Cu süspansiyonları elde edilmiştir. Tuz taneleri, tanecik boyutu 501-850 µm aralığında olacak şekilde öğütülmüştür. Yapı iskelesi üretimi için, tuz taneleri (1.5 g), 1 mL PDLLA-BG-Cu süspansiyonlarıyla (8 w/v) tamamen karıştırılarak viskoz macun kıvamına getirilmiştir. Daha sonra bu karışım silikon tüplere doldurulmuş ve bir cam pim yardımıyla elle sıkıştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen yapı iskelesi kalıpları (çap ≈ 9 mm, yükseklik ≈20 mm) bir inkübatör (37°C) içinde gece boyunca kurutulmuştur. Kalıplar, 2 gün süreyle 4 w/v PDLLA-BG-Cu süspansiyonları ile tekrar infiltre edilmiştir. Kurutulan kalıplar, 4-6 mm kalınlığında küçük silindirler halinde kesilmiş ve tuzun tam olarak çözülmesine izin vermek için 37° C'de 2.5-3 saat boyunca deiyonize su içinde bırakılmıştır. Sudan çıkarılan örnekler, yapı iskelelerinde kalan suyun tamamını uçurmak için bir inkübatör içine yerleştirilmiştir.

Gözenekli yapı iskelelerinin SBF içine batırılmadan önceki ve sonraki yüzey morfolojisi ve mikroyapılarını gözlemek için, 10 kV'de çalıştırılan bir taramalı elektron mikroskopu (SEM) (Quanta 250 FEG) kullanılmıştır. SEM

ölçümlerinden önce, tüm numuneler vakum altında platin ile kaplanmıştır.

3D yapı iskelelerinin X-ışını kırınımı (XRD) analizleri, numunelerin karakteristik fazlarını ve olası kristalliliğini araştırmak için, PANalytical X'Pert Pro difraktometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler, 10-60° aralığındaki 2θ açılarında CuKα radyasyonu (35V ve 40 mA'de) kullanılarak elde edilmiştir.

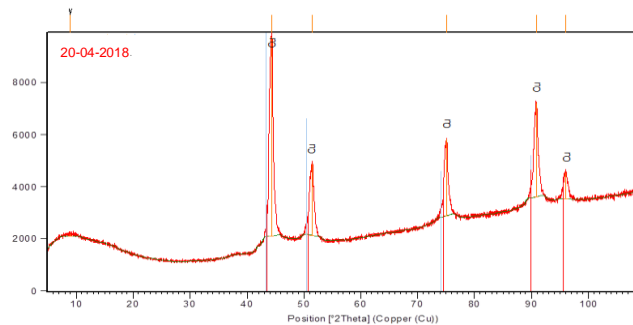
Fourier-dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) spektrumu bilgileri, 650-4000 bölgesindeki (cm⁻¹) geçirgenlik modunda çalışan bir Perkin Elmer Spectrum 100 Model spektrometresi kullanılarak toplanmıştır.

Yapı iskelelerinin biyoaktif davranış testi, Kokubo ve ark. (1990) tarafından tarif edildiği gibi, numunelerin SBF içinde bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Yapı iskelesi örnekleri 200 mL SBF içine batırılmış ve 37° C sıcaklıkta tutulan bir inkübatörde bekletilmişlerdir. Örnekler SBF'den 14 gün sonra çıkarılmış ve 37°C'deki inkübatörde 4 h boyunca kurutulmuştur. Numuneler daha sonra SEM, XRD ve FTIR kullanılarak karakterize edilmişlerdir. Yapı iskelelerinin 1, 7 ve 14 gün boyunca SBF içinde bekletilmesinin bir sonucu olarak, SBF çözeltisinde stronsiyum ve bakır iyon konsantrasyonunda meydana gelen değişim, indüktif çift plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler için, 13.56 MHz'de çalıştırılan (Ar ve N₂ gazı kullanan) bir Perkin Elmer Model Optima 2100 ICP kullanılmıştır.

3. Sonuçlar

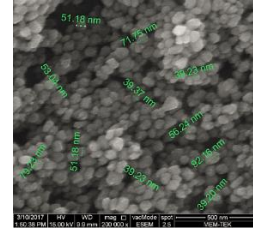
3.1. Mikroyapısal karakterizasyon

Üretilen bakır nanoparçacıklarının karakterizasyonu XRD ve SEM analizleri kullanılarak yapılmıştır. Şekil 1 standart JCPDS kartlarına göre, üretilen yapı iskelelerinin içeriğindeki bakır nanoparçacıklarına ait pik listesini göstermektedir. (20-04-2018) kodlu JCPDS kartına göre 44.10°, 51.20°, 75.5°, 91.2° ve 96.5° 2θ'da görülen pikler bakır nanoparçacıklarını temsil etmektedir.



Şekil 1. Bakır nanoparçacıklarının XRD analizi sonuçları

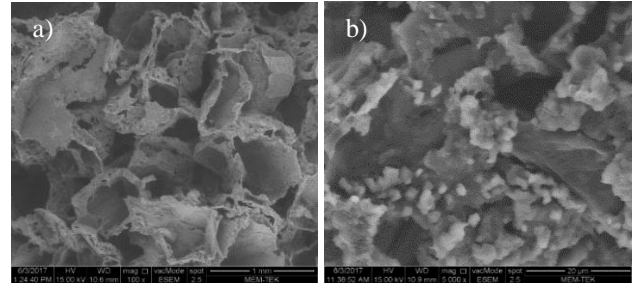
Şekil 2'de bakır nanoparçacıklarının SEM analizi verilmektedir. Yapılan ölçümler sonucunda, santrifüj yöntemi ile üretilen bakır nanoparçacıklarının tanecik boyutunun 39.7-85.0 nm arasında değiştiği saptanmıştır. 55 tanecik üzerinden yapılan ölçümler sonucunda da, ortalama tanecik boyutunun 60.0 ± 10.6 nm olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Bakır nanoparçacıklarının SEM görüntüleri

Üretilen yapı iskelelerinin makrogözenekli ağ yapısı Şekil 3'te gösterilmiştir. Şekil 3a'dan görülebileceği gibi birbirine bağlı gözenek yapısına sahip, oldukça gözenekli yapı iskeleleri üretilmiştir. Kompozit yapı iskelesi yüzeyinde polimer yapısının dışında görülen parlak beyaz parçacıklar, NaCl kristalinden farklı bir morfolojiye sahip oldukları için bunların biyoaktif cam parçacıkları oldukları düşünülmektedir (Şekil 3b). Bu sonuç, takip eden bölümdeki FTIR sonuçlarıyla da desteklenmektedir.

Kemik doku mühendisliğinde, hücrelerin büyümesi, bağlanması ve çoğalması, besinlerin ve metabolik atıkların taşınması için gözenekli bir yapıya ihtiyaç vardır. Ayrıca, hücrelerin istenen fiziksel forma dönüşmesini ve büyümüş dokunun vaskülarizasyonunu desteklemesi için de kontrol edilebilir ve birbirine bağlı bir gözenekliliğin olması zorunludur [Boccaccini ve ark., 2003, Hollister, 2005, 8, Rezwan ve ark., 2006]. SEM sonuçlarından, üretilen yapı iskelelerinin birbirine bağlı gözenekli bir yapıya sahip olmasının, yapı iskelelerinin hücre bağlanması, göçü ve vaskülarizasyonu için uygun olduğu sonuca varılmıştır.

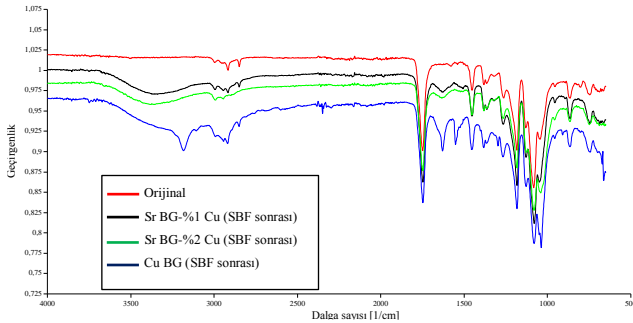


Şekil 3. Üretilen kompozit yapı iskelelerinin SEM görüntüleri

FTIR, XRD ve SEM analizleri, SBF ile temas halinde olan tüm yapı iskelesi yüzeyinde oluşan HA tabakasını saptamak için gerçekleştirilmiştir. SBF'de bekletme öncesi ve sonrasında, üretilen yapı iskelelerine ait FTIR spektrumları Şekil 4'te verilmiştir. SBF öncesi yapı iskelelerinin 3000 cm⁻¹ ve 2945 cm⁻¹'de bulunan pikleri, PDLLA'nın metil ve metilen gruplarının gerilmesinden kaynaklanmaktadır (Pereira ve ark., 2014). PDLLA'nın karakteristik bantlarından biri olan ester karbonil gruplarının gerilme modu (C = O) 1747 cm⁻¹'de gözükmemektedir (Leal ve ark., 2013). 1452 cm⁻¹ ve 1381 cm⁻¹'deki pikler sırasıyla CH₃ asimetrik ve δs CH₃ simetrik deformasyon modlarını göstermektedir (Pereira ve ark., 2014; Leal ve ark., 2013). 1263 cm⁻¹'de görünen pik, ester gruplarının -CO-O- gerilme bantlarına aittir (Pereira ve ark., 2014). Bu piklere ek olarak, 1183, 1135, 1082 ve 1043 cm⁻¹'deki piklerin ise =C-O gerilme bantları olduğu belirlenmiştir. ~864 cm⁻¹ ve ~750 cm⁻¹'deki iki pik, PDLLA'nın CH eğilme titreşim bantlarını

göstermektedir (Leal ve ark., 2013). Si-O-Si asimetrik gerilme titreşimine karşılık gelen bant, 1080 cm^{-1} 'de (Catauno ve ark., 2015) saptanmıştır. 950 cm^{-1} civarındaki pik, non-bridging oksijen içeren Si-O-Ca bağlarını göstermektedir (Catauno ve ark., 2015). SBF öncesi yapı iskelesi numunesinin FTIR spektrumu, kullanılan biyocam ağ yapısının tüm özelliklerinin üretilen yapı iskelesinde de görüldüğünü kanıtlamaktadır.

SBF'de bekletme sonrasındaki yapı iskelelerinin FTIR spektrumunda, HA'nin kristal yapısında bulunan, yapısal OH- grubunun gerilmesini karakterize eden geniş band 3000 ila 3600 cm^{-1} aralığında görülmektedir (Akram ve ark., 2015). 3186 cm^{-1} ve 2917 cm^{-1} 'deki pikler, sırasıyla CO_3 grupları (Ryszkowska ve ark., 2010) ve HA'nın C-H bantlarını karakterize (Wan ve ark., 2015) etmektedir. 1630 cm^{-1} ve 1550 cm^{-1} 'deki pikler ise, su absorpsiyon bandına ve CO_3 (ν_3) titreşim piklerine aittir (Sofronia ve ark., 2014). Yapı iskelelerine ait FTIR spektrumları incelendiğinde, SBF öncesi ve sonrası spektrumlarında bir takım farklılıklar gözlenmiştir. 1043 cm^{-1} 'deki pikin 1035 cm^{-1} 'e kaydığı ve bu pikin SBF öncesindeki yapı iskelesinin spektrumu ile kıyaslandığında daha büyük ve daha keskin bir bant haline geldiği saptanmıştır. Pikteki bu değişimin nedeninin, oluşan PO_4^{3-} gruplarının simetrik gerilme ve eğilme moduyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Akram ve ark., 2015; Sofronia ve ark., 2014). SBF'de bekletme sonrası tüm numunelerin FTIR spektrum sonuçları, yapı iskesinin her tarafında HA oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir.

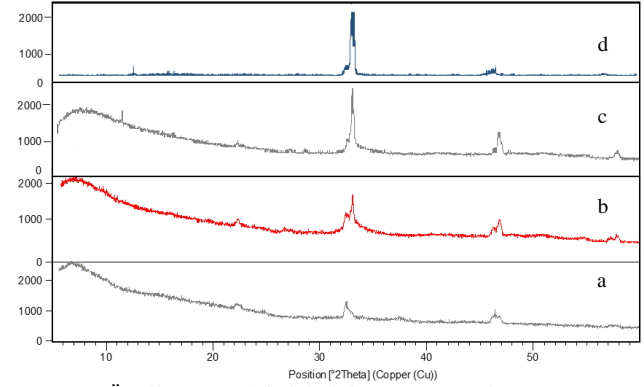


Şekil 4. Üretilen yapı iskelelerinin SBF öncesi ve sonrası FTIR spektrumları

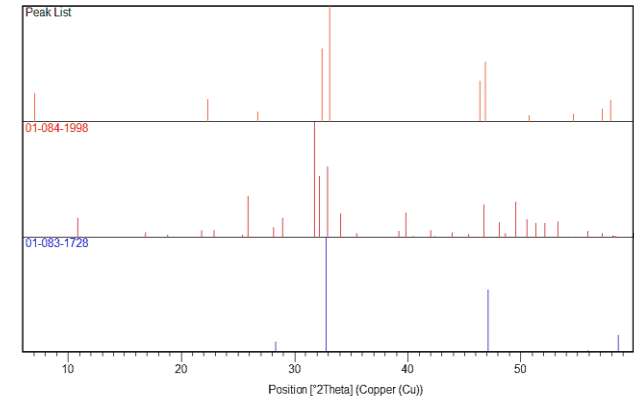
SBF'de bekletme öncesi ve sonrasında, üretilen tüm yapı iskeleleri için XRD analizleri Şekil 5'te verilmiştir. Şekil 6 ise, standart JCPDS kartlarına göre, üretilen yapı iskelelerinin içeriğindeki NaCl ve HA tabakası kristal yapısının pik listesini göstermektedir. (01-083-1728) kodlu JCPDS kartına göre 32.8°, 47.1° ve 58.5° 2 θ 'da görülen pikler NaCl'ü, (01-084-1998) kodlu JCPDS kartına göre 33° ve 48° 2 θ 'da görülen pikler HA'ı temsil etmektedir. NaCl'e ait çıkan pikler, yapı iskelesi içinde halen çözünmemiş halde NaCl kristallerinin kaldığını göstermektedir.

Şekil 5 incelendiğinde, yapı iskelesi orijinal örnekle kıyaslandığında, SBF içinde 14 gün bekletme süresi sonunda 33° 2 θ 'da görülen pikin şiddetinin ve bant genişliğinin arttığı saptanmıştır. Bu da kompozit yapı iskelesi yüzeyinde HA tabakasının oluştuğunu

göstermektedir. 33° 2 θ 'da ki bu pik, daha önce belirtildiği gibi (01-084-1998 kodlu JCPDS standart kartına göre), HA tabakasının oluşumunu temsil etmektedir. Ayrıca XRD analizi, yapı iskelesi yüzeyindeki HA oluşumunun FTIR sonuçlarını doğruladığını ortaya koymuştur.

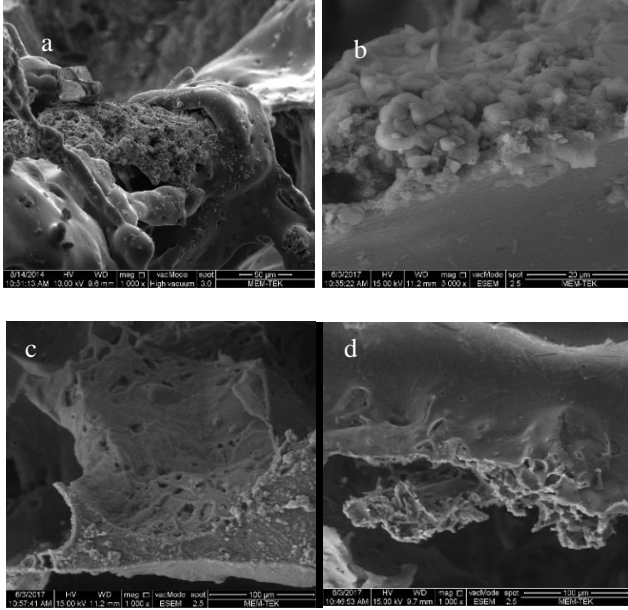


Şekil 5. Üretilen yapı iskelelerinin SBF öncesi (a) ve sonrası (b,c,d) XRD analizi sonuçları: (b) Sr katkılı BG +%2 wt Cu nanoparçacıkları (c) Sr katkılı BG +%1 wt Cu nanoparçacıkları (d) Cu katkılı BG



Şekil 6. Standart JCPDS kartlarına göre yapı iskelesinde saptanan HA tabakasının ve NaCl kristalinin pik listesi

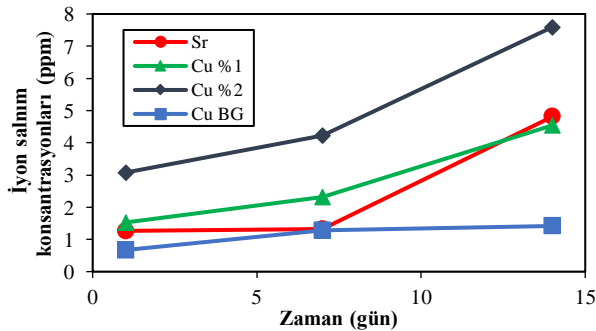
SEM, biyoaktif yapı iskeleleri yüzeyinde oluşan bir HA tabakası hakkında bilgi vermektedir. SBF'ye daldırıldıktan 14 gün sonra, üretilen tüm yapı iskelelerinin SEM görüntüleri Şekil 7'de verilmiştir. Şekil 7'den görüleceği üzere, yapı iskelesi yüzeyleri yeni oluşturulmuş bir HA tabakası ile kaplanmıştır. Yapı iskelesi yüzeylerinde bazı küçük parçacıklar oluşmuştur. Bu HA kristallerinin, BG parçacıklarının SBF ile temasının bir sonucu olarak oluştuğu açıktır. Hench tarafından önerilen ve genel olarak bilinen HA oluşum mekanizmasının, yapı iskelesi yüzeyi ile SBF çözeltisi arasındaki iyonik değişime dayandığı bilinmektedir (Hench ve ark., 1970). Şekil 7'den görülebileceği gibi, polimer tabakası üzerinde oluşan küçük boşluklar, polimer matrisinin kaybolmasına kanıt olarak gösterilebilir. Bu polimer matrisine gömülü olan BG parçacıklarının SBF ile temas etme şansı bularak, yapı iskelesi yüzeyinde HA tabakasının oluşumuna neden olduğu anlamına gelmektedir [Hench ve ark., 1970, Erol ve ark., 2012b, Erol ve ark., 2012c].



Şekil 7. Üretilen kompozit yapı iskelelerinin SBF sonrası (14 gün) SEM görüntüleri a) Cu katkılı BG, b/c) Sr katkılı BG-%2 Cu nanoparçacıklı, d) Sr katkılı BG-%1 Cu nanoparçacıklı

3.2. Cu ve Sr salımı

İyon değişimi sürecini cam çözünme hızı ile ilişkilendirmek için, yapı iskelelerinin bakır ve stronsiyum salım davranışları belirlenmiştir. Şekil 8, yapı iskelesi örneklerinin SBF çözeltisinde bekletilmeleri sonrasında çözültüye geçen Cu ve Sr iyonlarının konsantrasyonlarını göstermektedir. Şekil 8'den görülebileceği gibi, Cu ve Sr iyon miktarları SBF içinde bekletilme süresinin uzamasıyla artmıştır. Bu sonuç, camın yapısında bulunan Sr iyonu ile yapı iskelesi yapımında kullanılan Cu nanoparçacıklarının iyon değişim prosesi temeline dayalı gerçekleşen camın çözünmesi ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca, Cu katkılı BG kullanılarak üretilen yapı iskelesinden olan Cu salımının, Cu nanoparçacıkların kullanıldığı yapı iskelelerinden olan Cu salımından oldukça düşük kaldığı açıkça görülmektedir. Bunun nedeni, camın yapısında bulunan Cu iyonlarının çözünmesinin, yapı iskelesine sonradan ilave edilen Cu nanoparçacıklarının serbest kalmasından daha zor olduğu gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, %1 Cu nanoparçacıkları içeren yapı iskelesinden olan Cu salımı ile Sr iyon salım konsantrasyonlarının hemen hemen aynı olduğu da açıkça görülmektedir (Şekil 8).



Şekil 8. Yapı iskelesinden Cu ve Sr iyon salım konsantrasyonlarının zamanla değişimi

4. Tartışma

Bu çalışmada, Cu katkılı BG ve Sr katkılı BG ile bakır nanoparçacıklarının varlığında 3D biyoaktif cam-PDLLA kompozit gözenekli yapı iskeleleri, modifiye edilmiş çözücü döküm ve tanecik uzaklaştırma yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Yapılan FTIR, XRD ve SEM analiz sonuçları, üretilen tüm yapı iskelesi yüzeylerinde SBF sonrasında HA oluşumunu ortaya koymuştur. Ayrıca, terapötik iyon salımları sonuçlarına bakıldığında, Sr iyon salımı 1.27-4.81 ppm aralığında iken, Cu iyon salımları sırasıyla, Cu katkılı BG için 0.67-1.42 ppm, Sr katkılı BG-%1 Cu için 1.53-4.54 ppm, Sr katkılı BG-%2 Cu için 3.08-7.59 ppm olarak bulunmuştur. Genel sonuçlar, bu çalışmada üretilen kompozit yapı iskelelerinin kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için osteojenik, anjiyojenik ve antibakteriyel potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir.

Kaynaklar

- Akram M, Alshemary AZ, Goh YF, Ibrahim WAW, Lintang HO, Hussain R 2015. Continuous microwave flow synthesis of mesoporous hydroxyapatite. *Material Science of Engineering C*, 56: 356–362.
- Boccaccini AR, Maquet V 2003. Bioresorbable and bioactive polymer Bioglass®composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. *Composites Science and Technology*, 63(16): 2417–2429.
- Catauro M, Bollino F, Renella RA, Papale F 2015. Sol-gel synthesis of SiO₂-CaO-P₂O₅ glasses: Influence of the heat treatment on their bioactivity and biocompatibility. *Ceramics International*, 41: 12578–12588.
- Chen Q, Roether JA, Boccaccini AR 2008a. Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials. *Topics in Tissue Engineering*, Vol. 4 (Ch. 6), Biomaterials and Tissue Engineering Group.
- Chen YW, Shi GQ, Ding YL, Yu XX, Zhang XH, Zhao CS, et al. 2008b. In vitro study on the influence of strontium-doped calcium polyphosphate on the angiogenesis-related behaviors of HUVECs. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 19: 2655–2662.
- Correlo VM, Oliveira JM, Mano JF, Neves NM, Reis RL 2011. Natural origin materials for bone tissue engineering-properties, processing, and performance. *Principles of Regenerative Medicine*, 2nd ed., (Ch. 32, Part 3), London: Academic Press.
- Erol MM, Mouriño V, Newby P, Chatzistavrou X, Roether JA, Hupa L, Boccaccini AR 2012a. Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 8: 792–801.
- Erol M, Özyuğuran A, Özarpat Ö, Küçükbayrak S 2012b. 3D Composite scaffolds using Strontium containing bioactive glasses. *Journal of European Ceramic Society*, 32: 2747–2755.
- Erol M, Özyuğuran A, Özarpat Ö, Küçükbayrak S 2012c. Investigation of Strontium effect on the bioactive behavior glasses in the system SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O-SrO. *Key Engineering Materials*, 493-494: 68-73.
- Gerhardt LC, Boccaccini AR 2010. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 3: 3867-3910.
- Hench LL, Splinter RJ, Allen WC 1971. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 5(6): 117–141.

- Hollister S 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 4: 518-524.
- Kaur G, Pandey P, Singh K, Homa D, Scott B, Pickrell G 2014. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication, and apatite formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102A: 254–274.
- Kokubo T, Huang ZT, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T 1990. Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic. *Journal of Biomedical. Material and Research*, 24(3): 331–343.
- Leal AI, Caridade SG, Ma J, Yu N, Gomes ME, Reis RL, Jansen JA, Walboomers XF, Mano JF 2013. Asymmetric PDLA membranes containing Bioglass® for guided tissue regeneration: Characterization and in vitro biological behavior. *Dental Materials*, 29: 427–436.
- Misra SK, Ansari TI, Valappil SP, Mohn D, Philip SE, Stark WJ, Roy I, Knowles JC, Salih V, Boccaccini AR 2010. Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 31: 2806-2815.
- Öztopalan DF, Durmuş AS 2017. Kemik grefti yerine biyoaktif cam kullanımı. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 10(1): 56-61.
- Pereira RV, Salmoriab GV, Mouraa MOC, Aragonesc Á, Fredela MC 2014. Scaffolds of PDLA/Bioglass 58S Produced via Selective Laser Sintering. *Materials Research*, 17(1): 33-38.
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18): 3413–3431.
- Ryszkowska JL, Auguścik M, Sheikh A, Boccaccini AR 2010. Biodegradable polyurethane composite scaffolds containing Bioglass for bone tissue engineering. *Composites Science and Technology*, 70: 1894–1908.
- Seeman E, Devogelaer JP, Lorenc R, Spector T, Brixen K, Balogh A, et al. 2008. Strontium ranelate reduces the risk of vertebral fractures in patients with osteopenia. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23: 433-438.
- Sofronia AM, Baies R, Anghel EM, Marinescu CA, Tanasescu S 2014. Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite. *Material Science of Engineering C*, 43: 153–163.
- Wan Y, Wu C, Xiong G, Zuo G, Jin J, Ren K, Zhu Y, Wang Z, Luo H 2015. Mechanical properties and cytotoxicity of nanoplate-like hydroxyapatite/polylactide nanocomposites prepared by intercalation technique. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 47: 29–37.
- Wang H, Zhao S, Zhou J, Shen Y, Huang W, Zhang C, et al. 2014. Evaluation of borate BG scaffolds as a controlled delivery system for Cu ions in stimulating osteogenesis and angiogenesis in bone healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 2: 8547-8557.
- Wang W, Yeung KW 2017. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2: 224-247.