

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KİTOSAN KATKILI ZN ESASLI HİDROKSİAPATİT
NUMUNELERİN *IN VİTRO* BİYOAKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Harun EFE

Yüksek Lisans Tezi
Anabilim Dalı: Biyoteknoloji
Programı: Biyoteknoloji
Danışman: Doç. Dr. Serhat KESER

AĞUSTOS-2019

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİTOSAN KATKILI ZN ESASLI HİDROKSİAPATİT NUMUNELERİN
IN VİTRO BİYOAKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Harun EFE

(161111101)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 29 Temmuz 2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 09 Ağustos 2019

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Serhat KESER

(F.Ü)



Diğer Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. İsmail TÜRKOĞLU

(F.Ü)



Dr. Öğr. Üyesi Gülden KOÇAK (Bingöl Ü)



AĞUSTOS-2019

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim süresince ve tez çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve birikimleriyle bana yol gösteren ve gerekli imkânları sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Serhat KESER’e çok teşekkür ederim.

Ayrıca Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümünden Doç. Dr. Ömer KAYĞILI’ya, Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden Prof. Dr. Sevda KIRBAĞ’a ve Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümünden Dr. Tankut ATEŞ’e destekleri dolayısıyla teşekkürü borç bilirim.

En önemlisi hep yanımda olan, büyüyüp bu günlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim ve haklarını asla ödeyemeyeceğim kıymetli aileme de çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinatörlüğünce **FF.18.31** No’lu Proje kapsamında desteklenmiştir.

Harun EFE
ELAZIĞ-2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET.....	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ	IX
SEMBOLLER LİSTESİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyomalzemeler	3
1.1.1. Metal ve Metal Alaşımlı Biyomalzemeler.....	3
1.1.2. Biyoseramikler.....	4
1.1.2.1. Biyoinert Seramikler.....	7
1.1.2.1.1. Alümina (Al_2O_3).....	7
1.1.2.1.2. Zirkonya (ZrO_2).....	8
1.1.2.2. Biyoaktif Seramikler.....	8
1.1.2.2.1. Cam ve Cam Seramikler – Biyocamlar:.....	9
1.1.2.2.2. Kalsiyum-Fosfat Seramikler	9
1.1.3. Polimerik Biyomalzemeler	15
1.1.3.1. Hidrojeller.....	16
1.1.3.2. Doğal Polimerler.....	16
1.1.3.2.1. Kollajen ve Jelatin.....	16
1.1.3.2.2. Kompozitler.....	16
1.1.3.2.3. Kitin ve Kitosan	17
1.2. Çinkonun Yaşamsal Fonksiyonları	19
2. YÖNTEM	20
2.2. Yapay Vücut Sıvısı (SBF) Uygulamaları	20
2.3. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	21
2.4. Karakterizasyon İşlemleri	21
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	22
3.1. X-ışını Kırınımı (XRD) Analiz Sonuçları	22
3.2. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi (FTIR) Analiz Sonuçları	26
3.3. Morfolojik İncelemeler	29

3.4.	Antimikrobiyal Aktivite.....	33
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
	KAYNAKLAR.....	36
	ÖZGEÇMİŞ	40



ÖZET

Kitosan Katkılı Zn Esaslı Hidroksiapatit Numunelerin *in Vitro* Biyoaktivitelerinin Araştırılması

Bu çalışmada, sol-jel metodu ile üretilen Çinko (Zn) esaslı kitosan katkılanmış hidroksiapatit (HAp) örneklerinin kristal yapıları, fonksiyonel grupları, morfolojik yapıları, elementel bileşimler, antimikrobiyal aktiviteleri ve yapay vücut sıvısı (SBF) içindeki yapısal değişimleri araştırıldı. Sentezlenen örneklerin kristal yapıları, XRD analizi tekniği ile fonksiyonel gruplar ise Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ile saptandı. Enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi ile donatılmış taramalı elektron mikroskopisi (SEM) cihazıyla, örneklerin morfolojileri ve elementel bileşimleri belirlendi. Çalışma sonunda, sentezlenen numunelerin antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Kitosan katkılanması ve SBF etkisi sonucunda kristalleşme yüzdelerinin değiştiği saptandı. Morfolojik olarak ise kayda değer herhangi bir değişiklik gözlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Hidroksiapatit (HAp); kitosan; SBF; antimikrobiyal aktivite; Zn-katkılanması; kristal yapı

SUMMARY

Investigation of in Vitro Bioactivities of Zn-Based Hydroxyapatite Samples Doped With Chitosan

In this study, the crystal structure, functional groups, morphological structure, elemental compositions, antimicrobial activity and structural changes in the simulated body fluid (SBF) of Zinc (Zn)-based hydroxyapatite (HAp) samples, synthesized by sol-gel method, doped with chitosan at different amounts were investigated. The crystal structure of the synthesized samples was determined by X-ray diffraction (XRD) technique; the functional groups of the samples were determined by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The morphologies and elemental compositions of the HAp samples were carried out by scanning electron microscopy equipped with energy dispersive X-ray (EDX) spectroscopy. It was observed that the synthesized samples had antimicrobial activity. Chitosan addition and the effect of SBF were found to change the crystallization percentages of the samples. No significant changes were observed as morphologically.

Keywords: Hydroxyapatite (HAp); SBF; chitosan; antimicrobial activity; Zn-doping; crystal structure

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Kemiğe ait kimyasal bileşimlerin ağırlıkça yüzdesi.	15
Şekil 3.1. Sentezlenen HAp örneklerinin SBF öncesi XRD analiz grafiği.	22
Şekil 3.2. Sentezlenen HAp örneklerinin 14 gün SBF sonrası XRD analiz grafiği.	23
Şekil 3.3. Sentezlenen HAp örneklerinin 28 gün SBF sonrası XRD analiz grafiği.	23
Şekil 3.5. Sentezlenen HAp örneklerinin 14 gün SBF sonrası FT-IR analiz grafiği.	27
Şekil 3.6. Sentezlenen HAp örneklerinin 28 gün SBF sonrası FT-IR analiz grafiği.	28
Şekil 3.7. Sentezlenen HAp örneklerinin SBF öncesi SEM görüntüleri ve EDX analiz sonuçları.	30
Şekil 3.8. Sentezlenen HAp örneklerinin 14 Gün SBF sonrası SEM görüntüleri ve EDX analiz sonuçları.	31
Şekil 3.9. Sentezlenen HAp örneklerinin 28 Gün SBF sonrası SEM görüntüleri ve EDX analiz sonuçları.	32

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Biyoseramiklerin Kullanım Alanları	6
Tablo 1.2. Ca/P oranlarına göre çeşitli kalsiyum fosfatlar	10
Tablo 1.3. HA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	12
Tablo 1.4. Kitosanın Kimyasal Özellikleri	18
Tablo 3.1. Üretilen ve SBF'de bekletilen numunelerin detaylı XRD analizi sonucunda elde edilen parametrelerin değerleri	25
Tablo 3.2. Üretilen HAp örneklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları (mm zone)	33

KISALTMALAR LİSTESİ

Al₂O₃	: Alümina
Ca	: Kalsiyum
Ca(OH)₂	: Kalsiyum Hidroksit
Ca₃(PO₄)	: Trikalsiyum Fosfat
CaO	: Kalsiyum Oksit
DAP	: Diamonyum fosfat
EDX	: Enerji dağılımlı X-ışını
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi
HAp	: Hidroksiapatit
KBr	: Potasyum bromür
kDA	: Kilodalton
Kv	: Kilovolt
MPa	: Megapascal
mPa	: Milipascal
NO₃⁻	: Nitrat
P₂O₅	: Fosfor Pentoksit
PA	: Poliasetol
PO₄	: Fosfat
PO₄⁻³	: Fosfat
PTFE	: Politetrafloretilen
PU	: Poliüretan
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SiO₂	: Silikon Dioksit
SR	: Silikon Kauçuk
TCP	: Trikalsiyum fosfat
XRD	: X-ışını kırınımı
Zn	: Çinko
ZrO₂	: Zirkonya
α-TCP	: Alfa trikalsiyum fosfat
β-TCP	: Beta trikalsiyum fosfat

SEMBOLLER LİSTESİ

a, b ve c	: Örgü parametreleri
α, β, γ	: Örgü açıları
β	: Yarı pik genişliği
ε	: Örgü gerilmesi
θ	: Kırınım açısı
λ	: X-ışınlarının dalga boyu
σ	: Örgü zorlanması
D	: Kristal büyüklüğü
V	: Birim hücre hacmi
$X_c\%$	: Kristalleşme yüzdesi
Y	: Young (esneklik) modül

1. GİRİŞ

İnsanların yaşamları boyunca farklı kaza ve/veya hastalıklara maruz kalmalarıyla bazı organ veya dokularında kalıcı hasarlar meydana gelebilmektedir. Bu yüzden vücuttaki hasar görmüş doku ve organların eski fonksiyonlarının geri kazandırılması veya yerlerine yenilerinin yerleştirilmesi amacıyla biyomalzemeler üretilmeye çalışılmıştır. Kelime anlamı olarak biyomalzeme, canlı vücudunda yerleştirildiği bölgede veya çevresinde bulunan diğer dokuların fonksiyonlarını olumsuz etkilemeyen ve enfeksiyon vb. durumlara neden olmayan malzemelere denmektedir. Bu malzemeler arasında seramikler, metaller, polimerler ve bunların kompozitleri sayılabilir (Hench ve Wilson, 1993).

Biyoteknoloji alanındaki gelişmeler günümüzde yeni bir bilimsel alanın ortaya çıkmasına neden olsa da; aslında yüzyıllar öncesinden beri bu bilimsel teknikler kullanılıyordu. Örneğin, tahta ve kauçuk geçmişte de kullanılan doğal bir biyomalzemeler arasında yer almaktadır. Altının diş hekimliğinde kullanımı ise yaklaşık 2 bin yıl öncesine dayanmaktadır. XIX. Yüzyıl ortalarından itibaren ise vücut içi implantları, 1880'lerde ise fildişinden protezler geliştirilmeye başlanmıştır. İlk metal protez olarak kabul edilen vitallum ise 1938'de üretilmiş, ancak üzerinde önemle durulan biyouyumluluk kriteri yani canlı vücudunda ciddi anlamda metal korozyonu ve toksik olabilecek tehlikeli yan ürünler meydana getirmiştir. XX. Yüzyılın ikinci yarısından itibaren ise 50'lerde kan damarları, 60'larda kalça protezleri, 70'lerde ise sentetik ameliyat iplikleri kullanılmaya başlanmıştır. Tüm bilimsel çalışmalar, sonucu ne olursa olsun kendinden sonra gelen çalışmalara pozitif yönde katkılar sağlamıştır. Bu nedenle biyomalzeme gelişim ve araştırma sürecinde kullanılan bütün malzemeler pozitif ve/veya negatif etkileriyle de olsa biyoteknoloji alanına büyük katkılar vermiştir (Ayhan, 2002).

Peki neden teknolojik birikimin ile biyolojik özelliklerin bir araya getirilme ihtiyacı duydu ve yeni bir araştırma alanı olan biyoteknoloji doğdu? Bu sadece yapılmış olan yöntemler, teknikler ve elde edilen veriler ile tecrübeleri bilimin ışığında birleştirme bütünlüğüne verilen bir isimdir. Bilim dünyasını buna zorlayan nedenler arasında en önemlisi düzenli bir fizyolojik yaşam ve bu teknolojinin büyük bir pazarının olmasıdır. Biyomalzemeler, sahip oldukları özellikler ile bu yeni bilim dalının çok önemli bir konusu olmaya başlamıştır. Sadece var olduğu alana hizmet etmekle kalmayan bu malzemeler bütün insanlığın, hatta bütün canlıların hayatını kolaylaştırmaya katkı sağlamaktadır.

Biyoteknolojinin kullanım alanında Titanyum (Ti), alüminyum (Al), paslanmaz çelik, polimetil metakrilat (PMMA), hidroksiapatit (HAp), poliüretan (PU), politetrafloroetilen (PTFE), poliasetal (PA), teflon, platin elektrotlar, silikon kauçuk (SR), hidrojel, kalojenler vb. maddeler yer almaktadır. Bu malzemelerin kullanım alanları arasında iskelet-kemik sistemleri (eklemler, kırık kemik uçları, kemik dolgu maddeleri, yapay tendonlar ve diş implantları), kalp-damar sistemleri (kan damarları, kalp kapakçıkları, kataterler), organlar (yapay kalp), duyu organları (iç kulak kanalı, göz içi lens, kontakt lens, kornea bandajı) sayılabilir. Bu malzemelerin biyouyumluluk özellikleri neden önemlidir? Çünkü kullanılan malzemenin canlı dokuya bağlanması ve/veya vücudun bu malzemelere cevabı biyoaktif ise o malzemelere biyouyumlu malzemeler, kısaca biyomalzemeler adı verilmektedir. Bunun anlamı şudur: Bu malzeme toksik değildir ve doku-implant ara yüzeyinde bağlanma özelliğine sahiptir. Eğer üretilen biyomalzeme, değişik kalınlıklarda fibröz doku oluşumunu tetikliyorsa biyo inert adı verilir ve bu malzeme toksik değildir. Üretilen biyomalzeme, çevresindeki dokunun yerini alıyorsa, o biyomalzeme çözünür yapıdadır ve toksik etkiye sahip değildir. Ancak üretilen malzemeye vücudun verdiği tepki iltihaplanma, pıhtı oluşumu ve/veya çevre dokularda tahribat ise o malzeme toksik olarak tanımlanır (Ayhan, 2002).

Bütün teknolojik gelişmelere rağmen neden hala mükemmel bir biyouyumluluğa sahip bir malzeme sentezi gerçekleştirilmiş değildir? Metaller, seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler biyouyumluluğu yüksek biyomalzemelerdir. Böyle olmakla beraber her malzemenin farklı bir kullanım alanı mevcuttur. Örneğin polimerler ortopedik alanda mekanik dayanım göstermezler, yapılarına aşırı sıvı olarak antioksidan etki gösterirler. Ayrıca polimerler kullanımlarının öncesinde otoklav, etilen oksit, ^{60}Co radyasyonu vb. sterilizasyon işlemlerinden kolaylıkla ve kalıcı olarak etkilenmektedirler. Metaller daha dayanıklı ve güçlüdür fakat vücut içinde korozyona uğramaları, dokulara kıyasla sert olmaları, alerjik tepkilere neden olacak salınımlar yapmaları kullanımlarını kısıtlamaktadır. Seramikler biyouyumlukta zirvede olmasına rağmen düşük mekanik dayanıklılığa sahiptirler ve kırılgan, işlenmesi zor, esnek olmayan yüksek yoğunluklu malzemelerdir. Kompozitler ise diğer tüm biyomalzemelere alternatif olarak kullanılabilmelerine karşın yaygın bir kullanım alanına sahip değildirler. Günümüz teknolojisine rağmen üretilen biyomalzemelerin, doğal biyolojik yapıda bulunan doku ve organlara fizyolojik olarak birebir benzemesi mümkün değildir. Ancak gerçeğe yaklaşım her alanda olduğu gibi burada da mümkündür (Ayhan, 2002).

1.1. Biyomalzemeler

Biyomalzemelerin kullanım alanları oldukça geniştir. Her ne kadar tıp alanında kullanıldıkları düşünülse de, veterinerler, eczacılık, tarım ve kozmetik alanında da kullanılmaktadırlar. Biyoteknolojik açıdan ise hücre teknolojisi, biyosensörler, biyoayırma, immobilizasyon, biyoçipler gibi alanlarda uygulama ortamı bulmaktadırlar.

1.1.1. Metal ve Metal Alaşım Biyomalzemeler

Metalik bağlarının kuvvetli oluşu kristalin yapıda oluşu mekaniksel karakterinin yüksek olması sebebiyle biyomalzeme üretiminde kullanımı yaygındır. Canlı organizmada kullanmak için üretilen ilk metal biyomalzeme Sherman-Vanadyum çeliğidir. Metal türevli malzeme içeriğinde Fe, Cu, Cr, Co, Ti, Ni, Mo, Ta ve V gibi metaller fazla miktarda bulunursa vücut için zararlı olma ihtimali ortaya çıkmaktadır. Metabolik faaliyetler sırasında vücudumuz bu metalleri doğal olarak taşıyıp kullanırken neden biyomalzeme olarak vücuda girdiğinde zararlı hale gelebiliyor? Bir metalin canlı organizma için biyouyumlu olabilmesi o metalin korozyona uğramasının minimum düzeyde olmasıyla bağlantılıdır. Doğal biyolojik faaliyetlerde eser miktarda bulunan bu metaller, aşırı miktarda olurlarsa çevreleriyle çeşitli kimyasal reaksiyonlara girerek hidroksit, klorür ve çözünmüş oksijenin vücut içindeki akışkanda gezinmesine neden olurlar. Korozyon kimyasal olarak; oksidasyon ($M + O_2 \rightarrow MO_2$), iyonizasyon ($M \rightarrow M^+ + e^-$ pH<7), hidroksilasyon ($2M + O_{2(aq)} + 2H_2O \rightarrow 2M(OH)_2$ pH>7) ve anyon/kasyonlarla reaksiyon ($MO^{2-} + HCl \rightarrow MOCl + OH^-$) olmak üzere dört farklı şekilde meydana gelir. Korozyon sonucunda hem hücreler zarar görür, hem de biyomalzemenin yarı ömrü azalır.

Altının biyomalzeme olarak kullanımı saf halinden daha çok %75'i altın, geriye kalanı Cu, Pt gibi metaller olan alaşımlarla olmaktadır. Çünkü alaşım halindeyken daha dayanıklıdır. Altın oranı %85 ve fazla olursa malzemenin yumuşaklığı artar, böylece dolgu malzemesi olarak kullanılabilir. Altın alaşımlarındaki altın oranı düşerse sertliği artar ve kalıp olarak kullanımı daha uygun olur. Altın grubu malzemeler kararlı, korozyona dayanıklı ve uzun ömürlüdür. Çelik de iyi bir biyomalzeme olarak bilinir ve kullanılır. Örneğin 316L olarak bilinen en iyi paslanmaz çelik modelidir. Buradaki L ile belirtilen C'nin değeridir. Temelde karbon çeliği ve alaşım çeliği olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Alaşım grubuna ait çelikler Cr, Co, Al, Pb, Cu, Mn, Ni, P, Mo, S, Ti, Si, V ve W

elementlerini içerebilir. Bu içeriklerin atomik yüzde olarak 0.001 katkılanması bile oluşan alaşımların işlenmesini, korozyon ve ısıl direnci gibi değerlerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. En iyi sonucu elde etmek için metallerin doğru oranlı şekilde karışımı yapılarak alaşım üretilmelidir. Örneğin 316 paslanmaz çelikte karbon içeriği %0.05 düşürülünce 316L formu elde edilmiştir. Titanyum (Ti) ise çeliğe göre daha hafif bir malzemedir. Ti alaşımları üretilirken yüksek sıcaklık uygulanmalı, oksijenin olmadığı vakumlu bir ortam sağlanmalıdır. Çünkü reaktivitesi yüksek olan bu element patlayıcı etki gösterebilmektedir. Ni-Ti alaşımı ısıl işlem uygulandığında ilk oluşturulduğu yapıya geri dönmektedir. Yapısında herhangi bir bozulma olduğunda, malzeme ısıtılınca eski şeklini almaktadır. Kafatası damar bağlantıları, diş köprüsü, ortopedik protez, yapay kalp kasları bu alaşımlardan üretilebilmektedir. Kobalt (Co) alaşımı, %65'i Co geriye kalanı Cr olan bir malzemedir. En yaygın kullanımı olanlar Co-Cr-Mo (dişçilik ve yapay eklemlerde) ve Co-Cr-Mo-Ni (diz-kalça eklem protezlerinde) alaşımlarıdır. Amalgam, diş dolgu maddesinin atası olarak kabul edilen bir malzemedir ve o da önemli alaşımlardan biridir (Ayhan, 2002).

1.1.2. Biyoseramikler

Seramikler insan hayatına girdikten sonra birçok değişikliğe uğrayarak kullanılmışlardır. Seramik, çok yüksek sıcaklıklarda pişirilmiş veya fırınlanmış toprak olarak tanımlanır. Suyla ıslatılınca şekil alan, su geçirgenliği az olan bir toprak türü kil, seramik yapımında yıllarca kullanılmıştır. Son 50 yıllık geçmişten bugüne seramikler, canlı vücudunda zarar gören, işlevini kaybeden doku ve organların onarımı ya da doğrudan o dokunun yerine implante edilmeye başlanmıştır. Biyoteknolojik gelişmelere paralel olarak seramik malzemeler sağlık alanında da doku kültür kapları, optik gözlük camları, endoskopide kullanılan fiber optikler, diş dolgu malzemesi, altın-porselen kaplama ve protez parçaları olarak üretilmeye ve kullanılmaya başlanmıştır. Biyoseramiklerin kullanım alanları Tablo 1.1'de gösterilmektedir. Biyoseramikler, mikroorganizmalara, pH, yüksek basınç, çözücü vb. faktörlere karşı dayanıklı ve dirençli malzemelerdir. Biyoseramiklerin alümina ve hidroksiapatit (HAp) gibi polikristalin yapıları seramikler, polietilen-HAp gibi biyoaktif kompozit seramikler ve biyoaktif cam seramikler gibi üretimleri mevcuttur. Biyoseramik malzemeler biyoinert, biyoaktif ve emilebilir olmak üzere farklı şekillerde sınıflandırılıp incelenebilirler. Canlı vücuduna yerleştirilen bütün malzemeler, organizma

tarafından bir kontrole tabi tutulur. Bu kontrolü bağışıklık sistemi yapar ve aslında organizmanın sağlıklı olup olmadığının da bir ölçüsüdür. Yapılan kontrol sonucunda biyomalzeme vücut tarafından savunma tepkisi olarak herhangi bir saldırıya uğramaz ise o biyomalzeme güvenilir bir etiket almaktadır. Bunun sonucunda o malzeme biyoyumluluğu yüksek bir malzeme olarak kabul edilir (Carter vd., 2007).



Tablo 1.1. Biyoseramiklerin Kullanım Alanları

Kafatası onarımı	• Biyoaktif cam
Göz lensi	• Alümina
Kulak implantları	• Alümina, Hidroksiapatit, Biyoaktif cam-seramik, Biyoaktif kompozitler
Yüz yapılandırmaları	• Alümina, Hidroksiapatit, Biyoaktif cam
Diş implantları	• Alümina, Hidroksiapatit, Hidroksiapatit kaplama, Biyoaktif cam
Çene büyütme	• Alümina, TCP, Biyoaktif cam
Omurga cerrahisi	• Biyoaktif cam-seramikler, Hidroksiapatit
Boşluk doldurma	• TCP, Kalsiyum ve fosfat tuzları, Biyoaktif cam granülleri, Biyoaktif cam-seramik granülleri
Ortopedik destek uygulamaları	• Alümina, Zirkonya, Hidroksiapatit kaplama, Biyoaktif cam-seramik kaplama
Kalça onarımı	• Biyoaktif cam-seramik
Yapay tendon ve bağlar	• Karbon fiber kompozitler
Eklemler	• Hidroksiapatit, Alümina, Zirkonya

Doku ile implant arasındaki bu kontrol mekanizmaları dikkate alınarak organizmaya uygun biyomalzemeler tasarlanmalı ve üretilmelidir. Bu durum tıpkı bir uçağa binebilmek için uymamız gereken kurallara benzer. Bilet, kimlik, pasaport, bagaj ağırlığı vb. durumlardan birinde herhangi bir sıkıntı veya eksiklik olduğunda uçağa binmemiz mümkün olmamaktadır. Bu nedenle üretilen biyomalzeme için öncelikli olarak implante edilecek dokunun ve organizmanın türü, yaşı, kan dolaşımı, arayüzey hareketliliği gibi özelliklerine ve üretilen implantın bileşimi, faz sayısı, yüzey morfolojisi, kimyasal reaksiyon vb. özelliklerine dikkat edilmelidir. Çünkü sayılan bütün bu faktörler biyoyumluluğu etkileyen, hatta belirleyen özelliklerdir. Genelde biyoseramiklerin biyoyumluluğu yüksektir çünkü yapısında toksik etki göstermeyen veya çok az gösteren Ca, K, Na, Mg, Zr, Ti, Zn vb. iyonlar vardır ve bunlar doğal yollarla canlı vücudunda hali hazırda bulunmaktadır (Carter vd., 2007).

1.1.2.1. Biyoinert Seramikler

Bu seramik türlerinde organizmadaki dokuyla mekanik yönden bir birleşme söz konusudur. Biyoinert seramiklerde biyomalzeme ile doku arasındaki etkileşim hızı düşük olduğu için bu tip seramikler inert karaktere sahiptirler. Bu biyomalzeme vücut dokusu ile temasa geçtiğinde doku ile malzeme arasında ipliksi bir yapı, yani bağ doku gelişimi başlar. Bu yapı kapsül şeklinde olup malzemenin çevresini tamamen kaplamaktadır. Oluşan bu kapsül bağ dokunun kalınlığı ve yoğunluğu seramik malzemenin türüne göre değişebilmektedir. İpliksi kapsül canlı dokudaki hücrelerin büyüebilmelerine imkân vermekte ve böylece yeni gelişen hücreler biyomalzemenin yapısına girebilmektedir. Bu tür seramikler inert karakterleri nedeniyle temas ettikleri dokuda degradasyona sebep olurken kendileri de mekanik aşınmaya uğrayabilirler. Degradasyon ürünlerinin yoğunluğu istenmeyen bir durumdur, ancak toksik değildir ve vücut tarafından düzenlenebilmektedir.

1.1.2.1.1. Alümina (Al_2O_3)

Al_2O_3 formülüyle gösterilen alümina %99,5'dan fazla saflığa, yüksek yoğunluğa, yüksek korozyon direncine ve yüksek biyoyumluluğa sahip bir bileşik olup, kalça protezi ve diş implantı olarak kullanılmaktadır. Yaklaşık 1600-1800 °C'de sinterlenip preslenerek hazırlanan α - Al_2O_3 seramik gruplarıdır. Sol-jel ve Bayer süreci denen iki yöntemle de

üretimi yapılabilmektedir. Sol-jel metoduyla dört aşamada alümina üretilir: hidroliz, peptizasyon, jel oluşumu ve alümina oluşumu. Bayer süreciyle kalsinasyon ve öğütmeye maruz bırakılarak oluşturulan alüminalar, geleneksel seramik ürünlerin üretilmesinde en çok kullanılan ham maddedir (Ma, 2003).

1.1.2.1.2. Zirkonya (ZrO_2)

Zirkonya doğada baddeleyit (ZrO_2) ve Zirkon ($ZrO_2.SiO_2$) adı verilen iki mineral şeklinde bulunmaktadır. Bu malzemenin özgünlüğünü sağlayan elektrik-ısı iletimine dirençli olması, kimyasal stabiliteye sahip olması ve yüksek sıcaklıklarda iyonik iletkenliğinin maksimum seviyede olmasıdır. Zirkonyanın üretimi ya cevherlerden doğrudan elde edilmesiyle, ya da Zr ihtiva eden çeşitli kimyasal bileşiklere yüksek sıcaklıklarda oksit ilavesiyle mümkün olmaktadır. Bu malzeme biyoteknolojik olarak diş ve kalça protezlerinde kullanılabilmektedir. Zirkonya kökenli seramiklerde 0.5 ppm düzeyinde U^{235} bulunabilmektedir. Bu radyoaktif element ihtiva etmesi durumu bu malzemenin biyomalzeme olarak kullanımını sınırlamaktadır. Çünkü hem gerilme indeksi azalmakta hem de kaplama karakteri düşük olmaktadır. Bu malzeme sahip olduğu radyoaktiviteyi gama ve alfa etkileşimi şeklinde göstermektedir. Bilindiği gibi alfa parçacıkları yüksek iyonik karaktere sahip olmaları nedeniyle sert ve yumuşak dokulara zarar verebilmektedir (Ma, 2003).

1.1.2.2. Biyoaktif Seramikler

Biyoaktif seramiklerde biyoinert seramik malzemelerde oluşan ipliksi kapsül söz konusu değildir. Bunun yerine malzeme ile onu çevreleyen doku arasında çeşitli biyokimyasal etkileşimler gözlenir. Biyolojik etkinlikleri oldukça yüksek olan bu seramikler, implante edildiği yerdeki doku hücrelerinin biyomalzeme içerisine doğru büyümesini ve gelişmesini sağlarlar. Bu gruba biyoaktif camlar, kalsiyum fosfat seramikleri ve hidroksiapatitler girmektedir. Bu malzemeler kemiğe implante edildiği zaman kemik ile bütünleşme-birleşme anlamına gelen osteointegrasyon denilen bir olay meydana gelmektedir. Bu özellik bu tür seramiklerin en önemli özelliği olarak kabul edilmektedir. Biyoinert biyomalzemelerdeki ipliksi kapsül gevşek bir yapılanma doğururken, osteointegrasyon biyoaktif seramiklerin yüksek gerilimlere daha kuvvetli

dirence sahip olmasını sağlamaktadırlar. Bu durum sayesinde biyoaktif biyomalzemeler kemiğin yenilenmesine, onarılmasına ve desteklenmesine önemli katkılar sağlayıp, vücudun tedaviye hızlı ve etkili bir iyileşme tepkisi vermesini gerçekleştirirler. Böylece hastanın fizyolojik ve fiziksel işlevlerini eskisine yakın bir şekilde yapmasını sağlarlar (Park, 2000).

1.1.2.2.1. Cam ve Cam Seramikler – Biyocamlar:

Bu tür cam malzemeler organik ve/veya inorganik kökenlidirler. Biyoaktif camlar, canlı organizmaya implante edildikleri zaman kimyasal yapısında bulunan silika gruplarının dokudaki Ca ve P ile yer değiştirmesi sonucu doku ile implant arasında biyokimyasal etkileşimler gerçekleşen biyomalzemelerdir (Er, 2005). Biyocamlar düşük kırılma tokluğuna sahiptirler, bu nedenle yüksek yoğunluklu kemik dokusu ile etkileşimleri sınırlı kalacağı için yüksek dayanıklılık gerektiren implantasyonlarda tercih edilmemektedirler. 45S5 ile gösterilen ve ağırlıkça %45 SiO₂ ihtiva eden, ayrıca CaO/P₂O₅ oranı 5:1 olan cam bileşimi ilk ve en iyi sonuç veren biyoaktif cam bileşimidir. En yüksek biyoyumluluğa sahip olan biyoaktif camın üretilmesi için bu oranları sabit ve stabil olması gerekmektedir. Çünkü yüksek biyoyumluluğu en çok camın yapısındaki P oranı etkilemektedir. 45S5'den daha düşük Ca/P oranlarına sahip diğer cam malzemelerde kemiğin yapısına herhangi bir bağlanma söz konusu olamamaktadır (Gross ve Strunz, 1985; Hench, 1998; Qiu vd., 2000).

1.1.2.2.2. Kalsiyum-Fosfat Seramikler

Kalsiyum-Fosfat seramikleri Ca ve P elementlerinin oksitler halinde bulunurlar. En önemlileri Hidroksiapatit (HAp, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), Trikalsiyum Fosfat (TCP, Ca₃(PO₄)₂) ve Oktakalsiyum fosfat (OCP, Ca₈H₂(PO₄)₆.5H₂O)'tır. Bu seramikler sulu ortamlarda ve nispeten düşük sıcaklıklarda (<900 °C) genellikle HAp formunda iken, kuru ortamlarda ve nispeten yüksek sıcaklıklarda (>900 °C) TCP formundadırlar. Apatit kemiğin kimyasal yapısında yer alan minerallere benzer özellikler taşıdığı için doku ile kolaylıkla pozitif uyum sağlamaktadır. Granül ve katı halde kemiğe dolgu malzemesi olarak kullanılabilirler. HAp ve TCP'nin *in vitro* ve *in vivo* ortamlardaki çözünürlükleri değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlik kimyasal kompozisyon, kristalinite ve çözeltinin pH'ına

bağlıdır. Ca-P seramiklerin canlı organizmalardaki çözünürlük derecelerine göre sıralanması α -TCP > β -TCP > HAp şeklindedir. HAp'ın vücut içindeki çözünebilirliği çok düşükken, β -TCP'nin ondan daha fazladır. Bundan dolayı en uygun çözünürlük derecesine ulaşmak ve uzun ömürlü biyomalzemenin üretilmesi için HAp/TCP ikili faz karışımları sentezlenerek kullanılmaktadır. Protez ve implantların üretim, kullanım ve uygulama alanlarında ticari açıdan çok önemli bir yeri olan bu seramik malzemeler, dayanım kuvvetleri zayıf olduğu için üzerine yük binen implantların üretiminde çok nadir kullanılmaktadırlar. Ca-P seramikleri gözenekli yapıda olabilirler. Bu tür implantların en önemli özelliği, kemik dokusu biyoseramik materyalin gözenekleri içinde gelişim gösterdiğinde mekanik açıdan yüksek stabiliteye sahip bir ara yüzey oluşturmalarıdır. Bu ara yüzey kemiğin rejenerasyonunda yapı iskelesi gibi işlev görür. Gözenekli implantlar yığın ya da ham haldeki formlarından daha zayıf olurlar, çünkü gözenek sayısı ve büyüklüğü arttıkça dayanıklılık azalacaktır. Ancak bu gözenekli yapı organizmadaki kemik dokusuna yapı olarak çok benzemektedir. Bu nedenle kemik kırılmalarında ve diş dolgularında Ca-P seramikleri ile tedavi uzun zamandan beri tercih edilmektedir (Paital, 2009). Tablo 1.2'de Ca/P oranlarına göre çeşitli kalsiyum fosfat türleri gösterilmiştir.

Tablo 1.2. Ca/P oranlarına göre çeşitli kalsiyum fosfatlar (Corbridge, 1990)

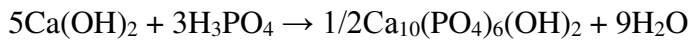
Ca/P	İsim	Formül	Kısaltma
2,00	Tetra-kalsiyum fosfat	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaO}$	TetCP
1,67	Hidroksiapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HAp
1,50	Tri-kalsiyum fosfat	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	TCP
1,33	Okta-kalsiyum fosfat	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	OCP
1,00	Dikalsiyumfosfat dihidrat	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD
1,00	Dikalsiyum fosfat	CaHPO_4	DCPA
1,00	Kalsiyum pirofosfat	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	CPP
1,00	Kalsiyum pirofosfat dihidrat	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	CPPD
0,7	Hepta-kalsiyum fosfat	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	HCP
0,67	Tetra-kalsiyum dihidrojen fosfat	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	TDHP
0,5	Mono-kalsiyum fosfat monohidrat	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	MCMP
0,5	Kalsiyum metafosfat	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	CMP

Hidroksiapatit (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$): Apatit adı verilen fosfat minerallerinden içeren bu seramik türünün üç farklı sınıfı vardır: OH^- iyonu içerenlere hidroksiapatit, F^- iyonu içerenlere fluoroapatit ve Cl^- iyonu içerenlere ise kloroapatit adı verilmektedir. Apatit

terimi Alman jeolog A.G. Werner tarafından 1789 yılında belirlenmiş olup, Latince “aldanma” anlamına gelen “apatê”den türetilmiştir. Apatitler değişik formlarda ve/veya renklerde olabildikleri için turmalin veya beril adı verilen başka mineraller ile karıştırılabilmektedirler. Apatitlerin genel kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(X)_2$ şeklinde gösterilmektedir. Burada X OH⁻, Cl⁻ veya F⁻ iyonu olabilmektedir. HAp numuneleri gözenekli bir yapıya sahip olduğu için osteokondüktif özellik gösterir. Bu da hücre-doku büyümesine, gelişmesine ve/veya yenilenmesine destek olmaktadır. Gözenekli yapının sayesinde malzeme ile kemik dokusu arasında uygun kaynaşma gerçekleşmektedir. Gözeneklerin diğer bir avantajı ise vücut sıvılarının biyomalzemeye taşınmasını kolaylaştırmasıdır. Aslında gözenekler malzemenin mukavemetini olumsuz anlamda etkilese de fizyolojik ve biyokimyasal olayların gerçekleşmesi için çok önemli bir avantajdır. Bu gözenekli yapının dezavantajlarının ortadan kaldırılması için kompozit yapıların kullanımı tercih edilmektedir.

HAp’ın kimyasal ve fiziksel özellikleri Tablo 1.3’de gösterilmektedir. Ca/P mol oranı HAp’da kemik ve dişlere en yakın oran olan 1,67’dir. Ağırlıkça ise Ca ve P oranları sırasıyla 39,84 ve 18,52’dir. HAp ayrıca hegzagonal bir yapıya sahiptir. Bu özellikler sayesinde kemikte bulunan Ca ve P’nin, vücut dışından bir kaynağı olarak HAp biyomalzemelerin kullanılabileceği aşıkardır (Pielichowska vd., 2010).

HAp üretimi için sol-jel yöntemi, kimyasal çöktürme, sprej-piroliz, emülsiyon işlemi, hidrotermal sentez ve mekanokimyasal gibi yöntemler kullanılabilmektedir. Bu yöntemler içerisinde kimyasal çöktürme işlemlerinin sadeliği, düşük sıcaklıkta yapılması ve yüksek ürün verimi açısından en önemlisi olarak öne çıkmaktadır (Kong, 2002; Kweh vd., 1999; Kumta, 2005). Sıvı içinde kimyasal çöktürme yöntemleri içinde en çok tercih edileni ise asit-temelli yöntemdir (Kumta, 2005). Bu yöntemin avantajı toksik maddelerin oluşmaması ve ürün olarak HAp’ın dışında sadece suyun (H₂O) oluşmasıdır (Nagai, 1980; Kumta, 2005).



Bu yöntemde reaksiyon çözeltisinin pH düzeyine dikkat edilmesi gerekmektedir. Çünkü pH seviyesinin 9.00’un altına düşerse kalsiyum monofosfat, 7.00’nin altına düşerse kalsiyum dihidrat oluşmaktadır (Afshar, 2003).

Tablo 1.3. HA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri (Murugan ve Ramakrishna, 2005)

Özellik	Değer
Molekül formülü	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Ca/P mol oranı	1,670
Kristal yapı	Hekzagonal
Baskı dayanımı (MPa)	400-900
Gerilme dayanımı (MPa)	115-200
Yoğunluk (g/m ³)	3,160
Bozunma sıcaklığı (°C)	>1000
Dielektrik sabiti	7,40
Isıl iletkenlik (W/cm.K)	0,013
Biyoaktiflik	Yüksek
Biyouygunluk	Yüksek
Biyobozunma	Düşük
Hücresel uygunluk	Yüksek
Kemik iletkenliği	Yüksek

HAp'ın endüstriyel anlamda üretilmesi için mercan kayalıkları, hayvan kemikleri, midye kabuğu, fildişi, yumurta kabuğu vb. doğal kaynaklar da tercih edilmektedir ancak, bu biyolojik apatitlerden üretilen HAp örneklerinin stokiometrisinde sıkıntılar olmaktadır. Genellikle bu durum Ca eksikliği ve onun yerine karbonat grubunun (CO_3^{2-}) bulunmasıyla kendini göstermektedir. Bu tür apatitlere, mineral olarak 'dahlit' adı da verilen karbohidroksiapatit denmektedir. Kimyasal olarak $(\text{Ca},\text{Mg},\text{Na})_{10}(\text{PO}_4,\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ formülüyle gösterilmektedirler. Bu HAp türlerinin yapılarındaki kafes hataları kristallliği olumsuz etkileyerek malzemenin kararlılığını düşürür ve çözünme eğilimini arttırmaktadır. Bu türden olumsuz özelliklerine rağmen biyolojik apatitler sentetik apatitlerle karşılaştırıldığı zaman bunların osteokondüktif özellikleri daha yüksek olup, kemik rejenerasyonunu daha iyi desteklemektedirler (Kumta, 2005).

HAp düşük kırılma tokluğuna sahip olduğu için yüke maruz kalan kemik ve diş gibi dokulara uygulanacağı zaman güçlendirici katkılarla beraber uygulanmaktadır. Bu katkılar arasında çeşitli partiküller, visker, plaka, stabilize edilmiş zirkonya ve bazı nano-partiküller sayılabilir. HAp malzemelerin mikro por çapı $<10\ \mu\text{m}$ iken, makro por çapı $>100\ \mu\text{m}$ 'dir. Bu por özelliği avantajları kemik hücrelerinin gelişimini, adhezyonunu ve vücut sıvısının malzeme içinde dolaşımını kolaylaştırmasıdır. Dezavantajı ise por özelliğinden kaynaklanan yapıdaki boşluklar sebebiyle malzemenin dayanıklılığının düşük olmasıdır.

HAp numuneleri yaklaşık 950-1300 °C sıcaklıklarda sinterlenmektedir. 1300 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda HAp kararlılığını kaybetmektedir (Afshar, 2003).

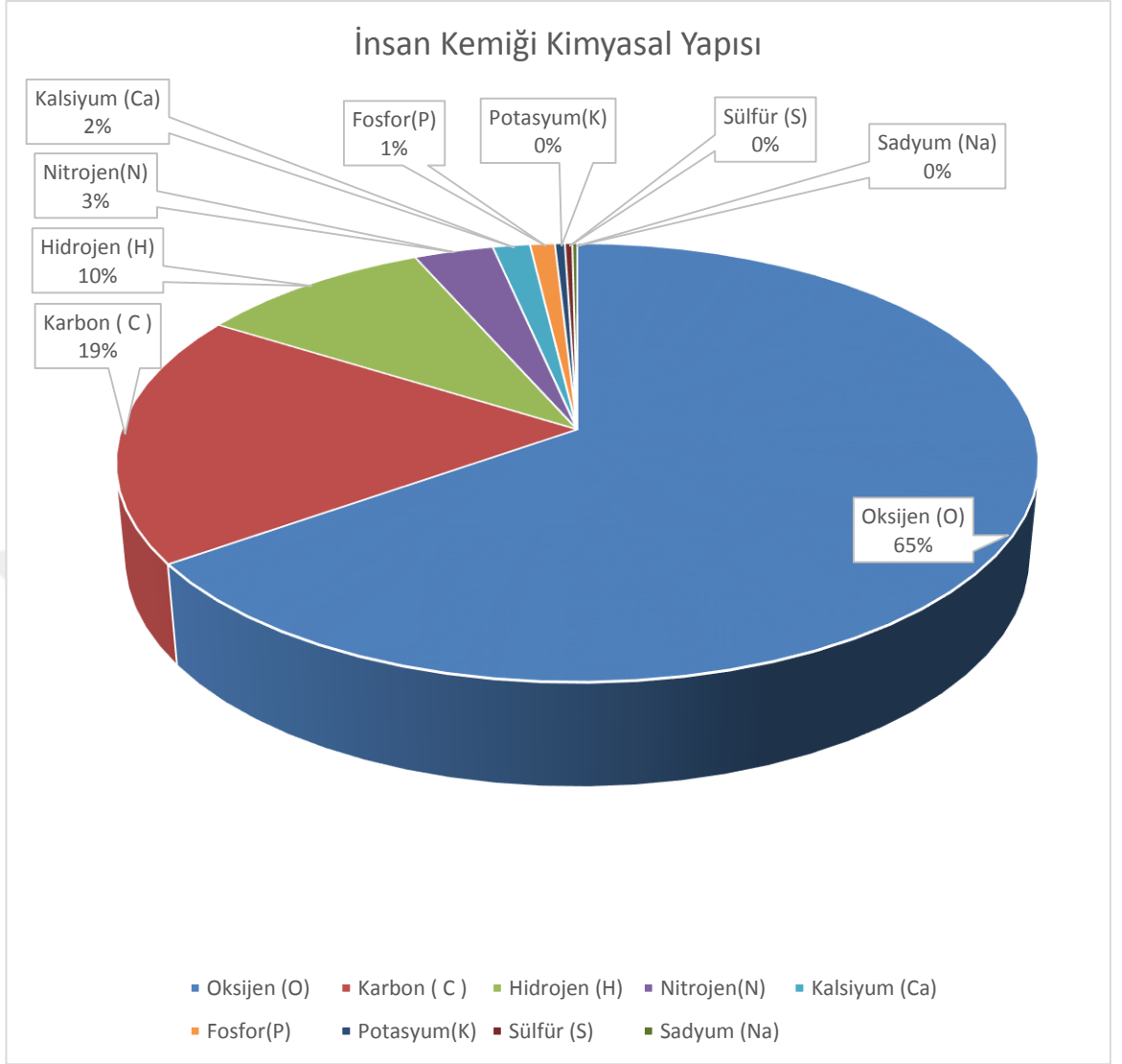
Biyolojik Hidroksiapatit: Canlı organizmalardaki kemikler, dişler vb. kısımların mineral fazını oluşturan biyolojik apatitlerin kompozisyonu, stokiyometrisi, mekanik ve fiziksel özellikleri sentetik HAp seramiklerden farklılıklar göstermektedir. Biyolojik kökenli apatitlerde genellikle Ca oranı daha düşüktür ve HAp'ın latis bölgelerinde farklı atomlar yer almaktadır. Biyolojik apatitlerin kimyasal formülü $(Ca,M)_{10}(PO_4,CO_3,Y)_6(OH,F,Cl)_2$ şeklindedir. Bu formülde M harfi K, Na, Mg gibi bir metali, Y ise PO_4^{-2} , CO_3^{-2} , SO_4^{-2} gibi iyon gruplarını ifade etmektedir. Biyolojik apatitlerde P gruplarının yerine CO_3^{-2} grupları gelirken, Ca iyonları yerine de Na iyonları gelmektedir. Sentetik HAp üretimi endüstriyel olarak gerçekleştirilmektedir. Bu üretim metotlarından biri de sol-jel yöntemidir. Endüstriyel HAp'ın kristallliği, kararlı yapısı ve stokiyometrik kararlılığı ön plandadır. Ca/P molar oranı mineralin hangi amaçla ve hangi seviyede kullanılacağını belirlemektedir. Bu oran en 1/1 olmalıdır. Eğer daha düşük olursa asitlik derecesi azalır, Ca-P mineralinin çözünürlüğü artmaktadır. Şayet daha büyük olursa asitlik derecesi artar, çözünürlük azalmaktadır. Stokiyometrik olarak HAp'ın Ca/P molar oranı 1,670 ile en uygun orandır ve bu oran optimal değer olarak kabul edilmektedir. HAp'ın sulu ortamlarda pH 4,20-8,00 değerleri arasında stabil yapıda olduğu bilinmektedir. Apatitlerin vücut içindeki çözünürlük sıralanışı $ACP > \alpha-TCP > \beta-TCP > HAp$ şeklindedir. HAp malzemeler Tip A ve Tip B şeklinde iki grupta incelenmektedir. Tip A'da CO_3^{-2} grupları OH^- gruplarının yerini alıp, a-ekseninde yükselmeye, c-ekseninde ise düşmeye neden olmaktadır. Tip B'de ise CO_3^{-2} grupları PO_4^{-2} grupları yerine geçip, a-ekseninde düşmeye, c-ekseninde ise yükselmeye neden olmaktadır. Biyolojik apatitler daha çok Tip B özelliği taşımaktadırlar (İpekoğlu vd., 2003).

Yoğun Hidroksiapatit: TCP yapısındaki biyoseramikler 1920'lerden itibaren doku çalışmalarında kullanılırken, HAp tozları ise 1970'lerden itibaren medikal çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Günümüz teknolojisinde HAp tozları üretildikten sonra ve/veya üretim aşamasında istenilen şekilde biçimlendirilmekte, yüksek sıcaklıklarda sinterlenerek yapısındaki por ve gözenekler azaltılabilmektedir. Bunun sonucunda yoğun bir yapı elde edilebilmektedir. Bu olaya densifikasyon denmektedir ve sinterleme prosesinin olmazsa olmazı olarak kabul edilmektedir. Sinterleme aşamasında HAp tozlarının tanecik boyutları, tanecik şekilleri, porozitesi ve por boyutları gibi mikro yapısındaki özellikler değişime uğramaktadır. Bununla birlikte densifikasyon, tanecik ve tanecik sınırlarında çeşitli

kimyasal farklılıklar oluşturarak Ca-P biyoseramiklerin mekanik ve biyolojik aktivitelerini de etkilemektedir. Saf HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), ağırlıkça % 39,68 Ca, % 18,45 P içermektedir ve Ca/P oranı yüzde cinsinden 2,151 iken, mol cinsinden 1,667 şeklindedir. Yoğun HAp örneklerinin Ca/P oranları ihtiva ettiği β -TCP/HAp oranına göre farklılıklar gösterebilmektedir. XRD analiz sonuçlarına göre Ca/P oranı 1,67 ise HAp fazı belirginlik göstermektedir. Ancak Ca/P oranı 1,67'den düşük olunca TTCP, β -TCP, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$ ve $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ fazları da görülebilmektedir. Ca/P oranı 1,67'den büyük olunca ise HAp fazı ile birlikte CaO oluşumu da görülebilmektedir (Gümüşderelioğlu, 2002).

Poroz Hidroksiapatit: Poroz yapıya sahip HAp biyoseramikleri çoğunlukla kemik tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Bu malzemeler sahip oldukları makroporozite sayesinde yoğun malzemelere kıyasla daha yüksek biyouyumluluk gösterirler ve böylece yük taşımayan bölgelerde kemik dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadırlar. Makroporozite çok büyük bir avantaj sağlayarak bu malzemelerin kemik büyümesine ve kemik dokusuna tutunmaya pozitif anlamda katkılar sağlamaktadır. Bu tür avantajlarına rağmen poroz yapılar biyomalzemelerin mekanik özelliklerinde azalmaya ve korozyona sebep olabilmektedir.

Otogreft kelime anlamı olarak bir kişinin kendi dokusundan alınan parçanın başka bir yerdeki dokuya transfer edilmesi demektir. Allogreft ise genetik olarak aynı kimliğe ait olmayan ancak aynı türün bireyleri arasında yapılan doku veya organ nakline denmektedir. Allogreft ve otogreft için doku azlığı ve taşıdığı sağlık riskleri gibi dezavantajlar nedeniyle sentetik kemik vb. sert doku malzemelerinin üretimine ihtiyaç duyulmaktadır. İnsan kemiğine ait kimyasal bileşenler Şekil 1.1'de gösterilmektedir. Bu tür uygulamalarda HAp tercih edilmesinin sebeplerinden en önemlisi sert doku uygulamaları için kullanılacak bu biyomalzemenin mekanik, kimyasal ve morfolojik olarak kemik dokusuna benzerliği en yüksek olan bileşik olmasıdır (İpekoğlu, 2004).



Şekil 1.1. Kemiğe ait kimyasal bileşimlerin ağırlıkça yüzdesi.

1.1.3. Polimerik Biyomalzemeler

Polimerler uzun zincirli ve tekrarlanabilen küçük birimlere sahip moleküllerdir. Küçük tekrarlanabilen birimlere “mer” adı verilmektedir. Polimerler sentez edilirken kullanılan küçük molekül ağırlığına sahip birimlere ise “monomer” denmektedir. Polimerleşme reaksiyonları esnasında, monomerler zincir polimerizasyonu adı verilen doymuş hale gelirler veya H_2O ya da HCl gibi küçük moleküllerin yapıdan ayrılmasıyla değişime uğrayıp zincire katılmaktadırlar. Polimerler yapı taşları monomerlerden özellik bakımından büyük farklılıklar göstermektedirler. Selüloz, nişasta, DNA ve doğal kauçuk

gibi doğal polimerler olduğu gibi çok sayıda sentetik polimer de mevcuttur ve bunların birçoğu biyomalzeme olarak kullanılabilmektedir (Lee, 2000).

1.1.3.1. Hidrojeller

Hidrojel, çapraz bağlı polimerik yapıya ve suda şişebilme özelliğine sahip polimerlerdir. Bir veya daha fazla monomerin polimerizasyonu ile hazırlanmaktadır. Ana zinciri oluşturan birimler arasında van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları gibi çeşitli bağlanmalar mevcuttur. Bu bağlanmalar yüzünden çözünmeleri oldukça zordur. Hidrojeller sahip oldukları üstün özellikler nedeniyle son yıllarda tıbbi uygulamalarda oldukça ilgi çekmektedirler. Tıbbi öneme sahip en önemli hidrojellerden birisi poliakrilamiddir (Lee, 2000).

1.1.3.2. Doğal Polimerler

Biyolojik olarak canlı hücreler tarafından sentezlenen ve eşsiz fonksiyonel özelliklere sahip olan proteinler (elastin, kollajen, aktin vb.), polisakkaritler (nişasta, kitin, dekstran, selüloz vb.) ve polinükleotidler (RNA ve DNA gibi) gibi moleküller doğal polimerlerin en önemlileridir (Kiremitçi, 2002).

1.1.3.2.1. Kollajen ve Jelatin

Bağ dokusundaki hücreler metabolik reaksiyonlar çoğunda üretilen ürünlerinin büyük bir çoğunluğunu hücre dışı ekstraselüler aralığa gönderirler. Bu ürünler arasında kollajen, elastin ve çeşitli proteoglikanlar sayılabilmektedir. Örneğin kollajen kaynatıldığında tutkal oluşturan bir doku bileşeni olarak tanımlanmış ve bu şekilde adlandırılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar 19 farklı kollajen molekülü ve bu molekülleri kodlayan genler belirlenmiştir (Kiremitçi, 2002).

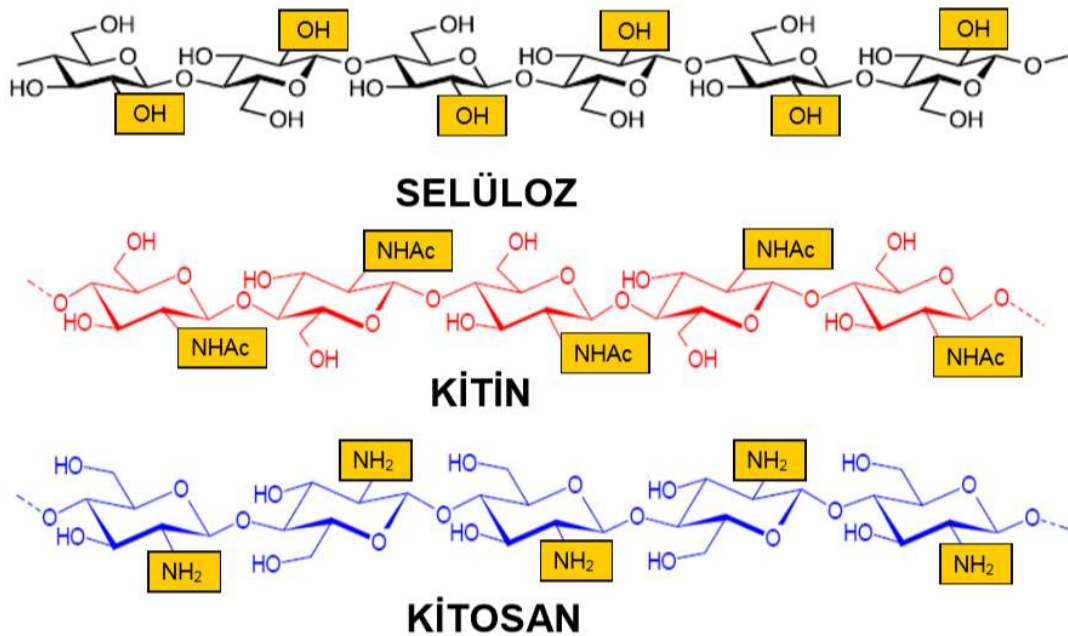
1.1.3.2.2. Kompozitler

Kompozit farklı kimyasal yapıya sahip iki veya daha fazla malzemenin kendi sınır ve özelliklerini koruyarak oluşturduğu birden fazla faza sahip malzeme olarak

tanımlanmaktadır. Canlı dokuya implante edilecek malzemenin sertlik derecesi temas edeceği dokularla aynı olacak şekilde ayarlanırsa bu durum oluşabilecek çeşitli deformasyonları engelleyebilmektedir. Bu tür kullanım olumsuzluklarını ortadan kaldırmak için çeşitli liflerle güçlendirilen polimerik malzemeler, yani kompozitler alternatif olarak kullanılabilir (Kiremitçi, 2002).

1.1.3.2.3. Kitin ve Kitosan

Kitin ve kitosan polimerleri benzersiz bir yapıda ve gelişmiş fonksiyonlarda olup çok boyutlu özelliklere sahip moleküllerdir. Bu doğal aminopolisakkaritler biyokimya ve endüstri alanında geniş bir kullanıma sahiptirler. Kitin, doğada oldukça bol bulunan bir mukopolisakkarittir ve selülozun ardından doğadaki en bol ikinci yenilenebilir biyopolimerdir. Kitosan ise, kitinin alkali deasetilasyonu ile elde edilen amorf bir poliaminosakkarit olup, doğal olarak meydana gelen birkaç katyonik polielektrolitten biridir (Meyers vd., 1989). Şekil 1.2’de kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapısı, Tablo 1.5’de ise kitosanın kimyasal özellikleri görülmektedir.

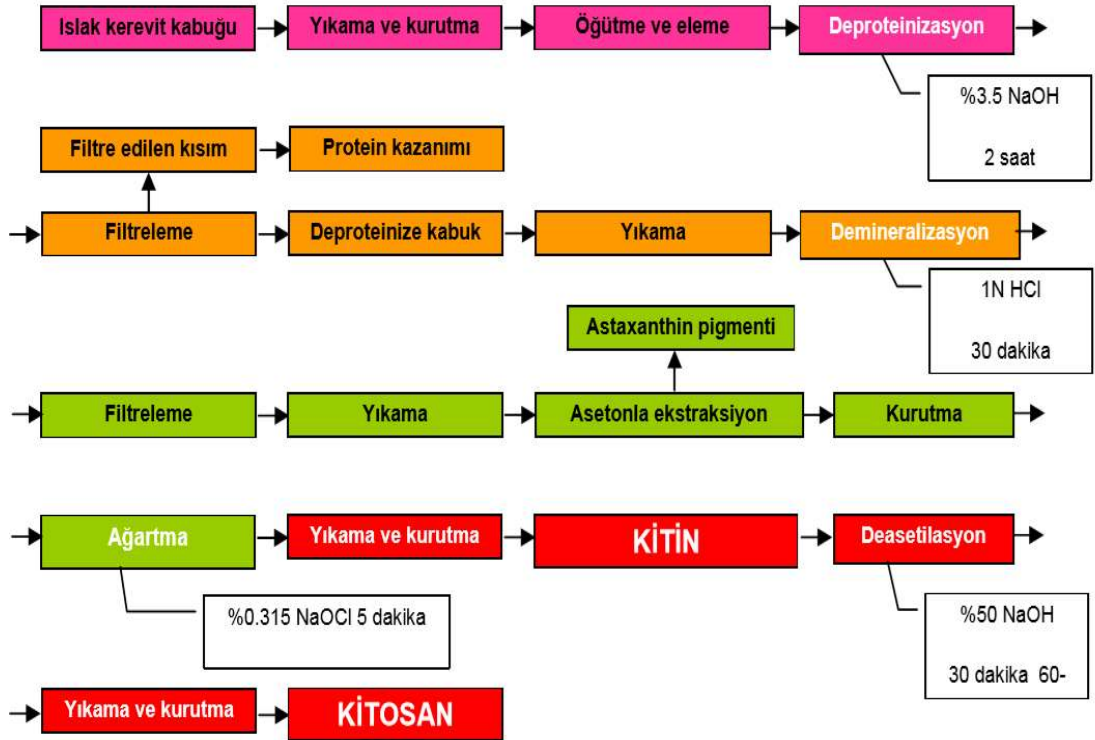


Şekil 1.2. Kitin, Kitosan ve Selülozun Kimyasal Yapısı (Lehmann, 1996)

Kitosan Üretimi: En bilinen kitosan üretim süreci atık deniz veya kara kabuklularından kitinin uzaklaştırılması ile kitinden kitosan elde edilmesidir. Şekil 1.3’de kitosan üretimine ait bir akış süreci gösterilmektedir. Bu şemadan da anlaşılacağı üzere bu süreç genel anlamda dört aşamadan oluşmaktadır: Deproteinizasyon, demineralizasyon, ağartma ve deasetilasyon aşamalarıdır (Meyers vd., 1989).

Tablo 1.4. Kitosanın Kimyasal Özellikleri

Özellik	Değer
Molekül ağırlığı	50-2000 kDa
Viskozite	<2000 mPaS
Su bağlama kapasitesi	%450-1150
Yağ bağlama kapasitesi	%314-535
Yığın yoğunluğu	0.06-0.39 g/cm ³
Renk	Donuk sarı-beyaz
Çözünürlük(suda)	pH<6.5



Şekil 1.3. Kitosan Üretim Şeması (Meyers vd., 1989)

1.2. Çinkonun Yaşamsal Fonksiyonları

Çinko (Zn) elementi, canlı hücrelerin yapı ve fonksiyon bütünlüğünün sağlanması için çok önemli bir rol oynamaktadır. Gen oluşumunda ve gelişiminde fonksiyonları vardır. UV radyasyona karşı koruma sağlar, yaraların iyileşmesini kolaylaştırır, bağışıklık ve nöropsikiyatrik fonksiyonlara katkıları mevcuttur. Bu nedenlerden dolayı her gün belirli bir miktar beslenmeyle alınması gereken biyokimyasal açıdan önemli bir eser element olarak kabul edilmektedir (Arcasoy, 2002). Bu elementin karbohidrat, lipit, protein, nükleik asitlerin sentezinde, gen ekspresyonunda, hem sentezinde, üremede ve embriyo gelişiminde önemli roller oynadığında dair bilimsel kanıtlar mevcuttur (Rostan, 2002). Gıdalarla alınan Zn'nin yaklaşık % 15-30'u emilirken geriye kalanı dışkı yoluyla dışarı atılmaktadır. Ayrıca idrar ve terleme yoluyla da bir miktarı vücut dışına atılmaktadır. Karaciğer çinko metabolizmasında başlıca rol oynayan organdır. Bu elementin eksikliğinde büyüme ve gelişme geriliği, hepatosplenomegali, hipogonadizm, parakeratoz, yara iyileşmesinde gecikmeler, apolesi, konjenital anomaliler, enfeksiyon duyarlılığında artmalar, bozulmuş nörofizyolojik performans, koku ve tat duyularında bozukluklar ortaya çıkabilmektedir (Saner vd., 2002).

2. YÖNTEM

2.1. Örneklerin Sentezi

HAp numunelerinin üretimi için kalsiyum nitrat tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), çinko nitrat heksahidrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), diamonyum hidrojen fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, DAP) ve kitosan kimyasal maddeleri kullanılmıştır. Örneklerin sentezi sol-jel metoduyla gerçekleştirilmiştir. % 99.56 (atomik yüzde) Ca, % 0.44 Zn içeren HAp numunelerine sentez aşamasında sırasıyla 0, 3, 6, 9 mL 0.05 M kitosan katkılanmıştır. Öncelikle uygun miktarda DAP saf suda çözöldü. Sonrasında gerekli miktarda kalsiyum nitrat tetrahidrat ve çinko nitrat heksahidrat başka bir kap içinde saf suyla çözöldü. Elde edilen bu çözelti DAP çözeltisine damla damla manyetik karıştırıcıda karıştırırken eklendi. Son olarak kitosan katkılanacak örneklere damla damla kitosan çözeltisi ilave edildi. Elde edilen son karışım 70 °C’de 5 saat karıştırılarak jel kıvamına getirildi. 185 °C’deki etüvde 24 saat bekletilen örnekler iyice kurutuldu. Kurutulan örnekler porselen krozelere alınarak kül fırınında 800 °C’de 4 saat boyunca kalsine edildi. Sonuç olarak HAp örnekleri beyaz tozlar halinde sentezlendi. Tüm numuneler için Zn’nun atomik yüzdesi % 0.44 olacak şekilde sabit tutulup, sadece katkılanan kitosan miktarı arttırıldı. Sentezlenen örnekler CTS1, CTS2, CTS3, CTS4 şeklinde adlandırıldı.

2.2. Yapay Vücut Sıvısı (SBF) Uygulamaları

Sentezlenen örneklerin *in vitro* incelemeleri yapay vücut sıvısı (SBF) içinde 14 ve 28 gün bekletilerek gerçekleştirildi. HAp örnekleri öncelikle 10 MPa basınç altında, 11 mm çapında ve 2 mm kalınlığında disklerle dönüştüröldü. Daha sonra içlerinde Kokubo (Kokubo, 1991) metoduyla hazırlanmış yapay vücut sıvısı (SBF) bulunan polietilen şişelere bu diskler ayrı ayrı yerleştirildi. Örneklerin bulunduğu şişeler vücut ısısına ayarlı (36.5 °C) etüvde 14 ve 28 gün bekletildi. Bahsi geçen süreler sonunda çıkarılan HAp örnekleri 3 defa ultra saf su ile yıkanıp kalıntılardan arındırılarak karakterizasyon işlemlerine alındı.

2.3. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları için öncelikle bütün HAp örnekleri 10 MPa basınç altında 11 mm çapında, 2 mm kalınlığında disklerle dönüştürüldü. İki tip bakteri *Staphylococcus aureus* COWAN 1 ve *Escherichia coli* ATCC 259225, tek tip de maya *Candida albicans* FMC 17 bu çalışmalar için kullanıldı. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi Collins ve Lyne (Collins, Lyne 1987) metoduna göre gerçekleştirildi. Bunun için bakteri suşları nutrient buyyona (Difco) aşıl原因arak 35 ± 0.1 °C de 24 saat, maya suşları ise malt ekstrakt buyyon (Difco) da 25 ± 0.1 °C de 48 saat süre ile inkübe edildi. Erlen mayerde sterilize edilen ve 45-50 °C ye kadar soğutulan Muller Hinton Agar (Oxoid) bakteri ve mayaların buyyondaki kültürü ile aşıl原因arak (10^6 bakteri/mL, 10^4 maya/mL) iyice çalkalandıktan sonra 9 cm çapındaki steril petri kutularına pipetlerle 15 mL dağıtıldı ve besiyerinin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Katılaşıyan agar üzerine kompleks emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4 °C de 1.5-2 saat bekletildikten sonra bakteri aşıl原因anan plaklar 37 ± 0.1 °C de 24 saat, maya aşıl原因anan plaklar ise 25 ± 0.1 °C de 3 gün süre ile inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşın inhibisyon zonları mm olarak değeriendirildi.

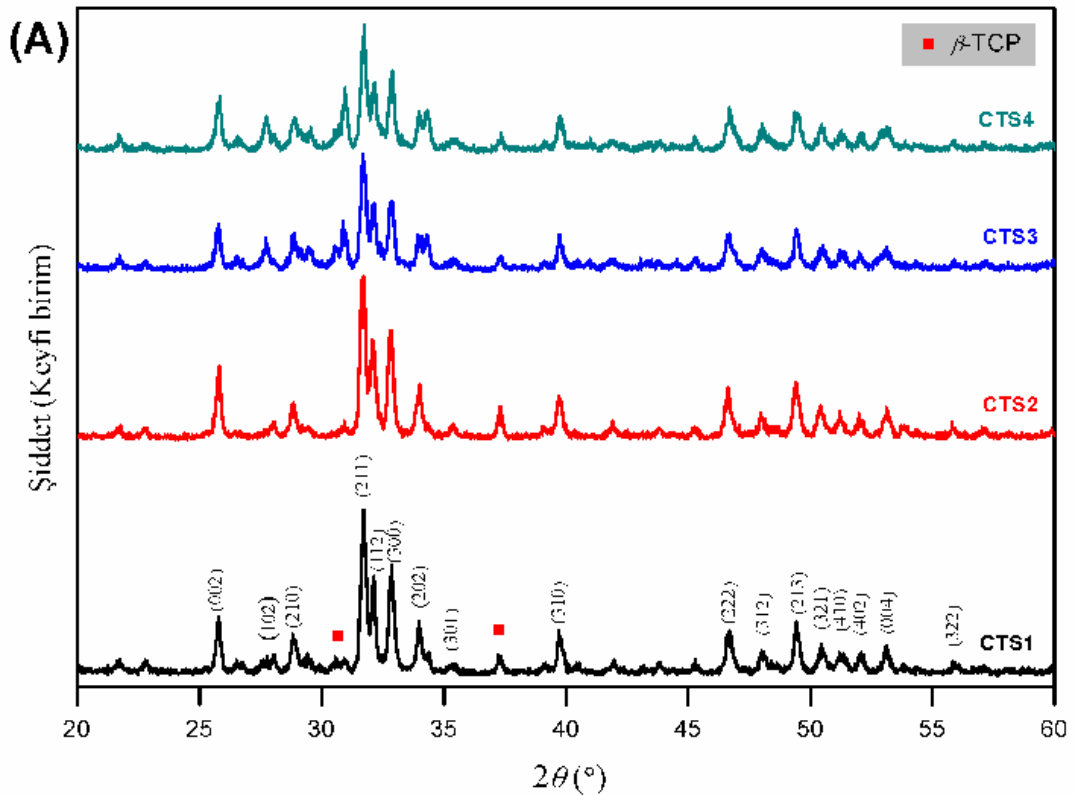
2.4. Karakterizasyon İşlemleri

Üretilen örneklerin karakterizasyonu ise şu testlerle gerçekleştirildi. XRD (X-ışınımı kırınımı) analizleri 40 mA ve 40 kV'de çalışın Rigaku RadB-Dmax II marka ve model cihaz yardımıyla 0.15406 nm dalga boylu (λ) CuK α radyasyonu ile kayıt altına alındı. Örneklerin FT-IT (Fourier dönüşümlü kızılötesi) spektroskopi incelemeleri Perkin Elmer Spectrum One cihazı yardımıyla 400-4000 cm⁻¹ spektral aralığında, KBr (potasyum bromür) pelet tekniğı ile gerçekleştirildi. Örneklerin morfolojileri ve görüntü alınan bölgelerin elementel bileşimleri ise SEM (taramalı elektron mikroskobu, Zeiss EVO-MA10) cihazında, EDX (enerji dağılımlı X-ışını) BrukerXFlash detektörü ile gerçekleştirildi.

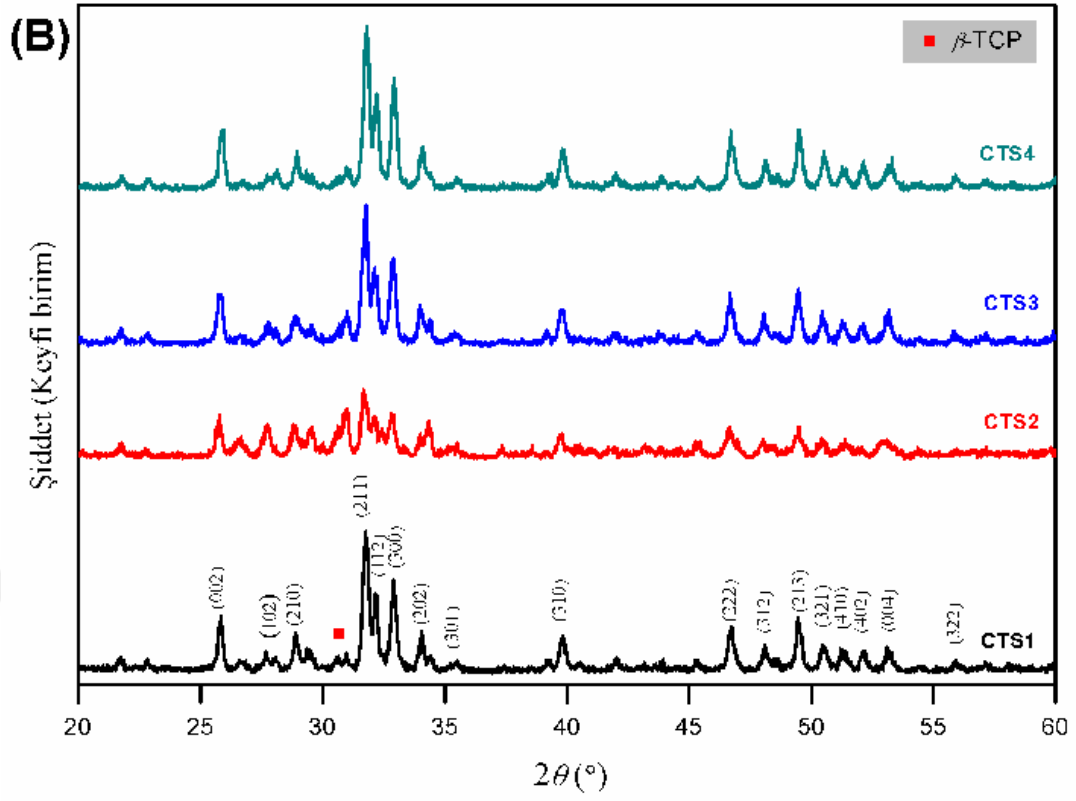
3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. X-ışını Kırınımı (XRD) Analiz Sonuçları

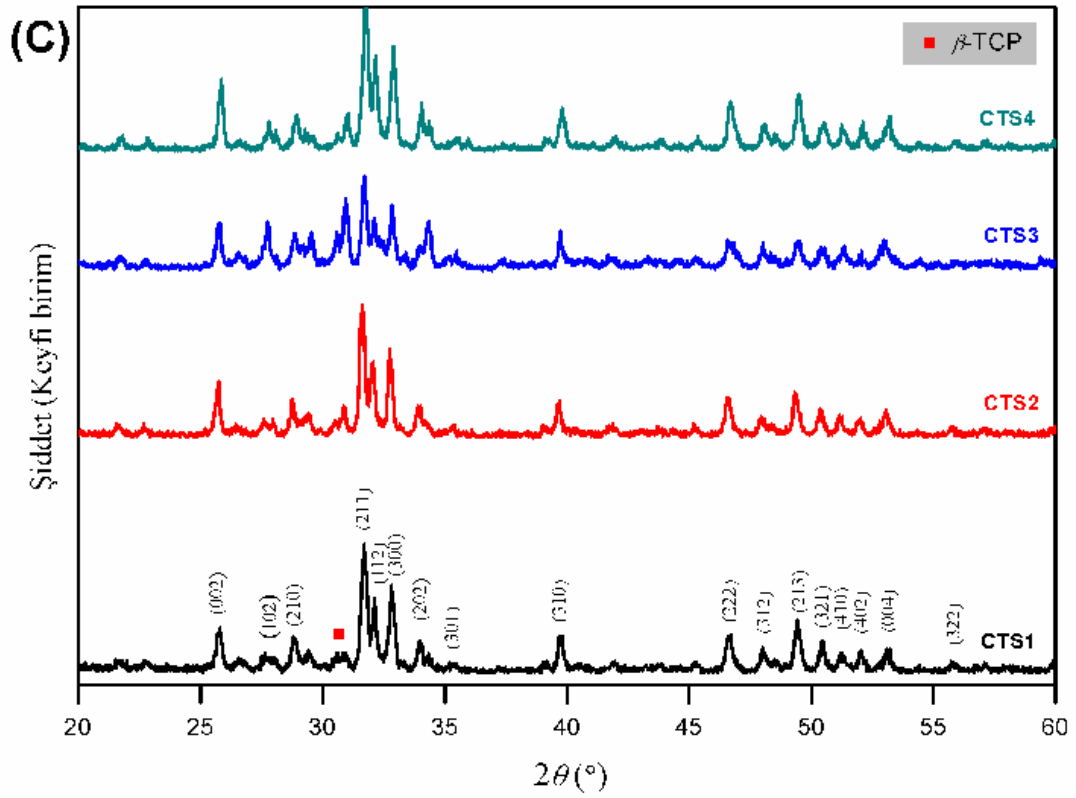
Sentezlenen numunelerin yapay vücut sıvısı (SBF) içerisine konmadan önceki, SBF içerisinde 14 ve 28 gün bekletildikten sonraki durumlarında alınan X-ışını kırınımı (XRD) analiz sonuçları Şekil 3.1-3.3’de gösterildiği gibidir. Tüm numuneler için de baskın olan faz HAp (JCPDS pdf no: 09-0432) olup, beta trikalsiyum fosfat (β -TCP, JCPDS pdf no: 09-0169) fazı ise ikincil faz olarak tespit edilmiştir. XRD grafiklerinden gerek kitosan katkısının gerekse SBF içerisinde kalma süresinin oluşan fazlar üzerinde etkili olduğunu görmek mümkündür.



Şekil 3.1. Sentezlenen HAp örneklerinin SBF öncesi XRD analiz grafiği.



Şekil 3.2. Sentezlenen HAp örneklerinin 14 gün SBF sonrası XRD analiz grafiği.



Şekil 3.3. Sentezlenen HAp örneklerinin 28 gün SBF sonrası XRD analiz grafiği.

Her bir numune için kristal büyüklüğü (D) değeri Scherrer denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Cullity, 1987).

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3.1.)$$

Burada β maksimum yarı pik genişliği, λ X-ışını dalga boyu ve θ ise Bragg açısıdır. Her bir kırınım deseni için D değeri (002) ve (300) düzlemleri için sırasıyla D_{002} ve D_{300} şeklinde ayrı ayrı hesaplanmış olup, elde edilen sonuçlar Tablo 5.1’de verildiği gibidir.

Her iki örgü parametresi (a ve c) ve birim hücre hacmi (V), sırasıyla aşağıdaki bağıntılar kullanılarak hesaplandı (Cullity, 1987).

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (3.2.)$$

$$V = 0.866a^2c \quad (3.3.)$$

Burada h , k ve l harfleri Miller indislerini temsil etmektedir.

Kristalleşme yüzdesi ($X_c\%$), (Landi vd., 2000) tarafından rapor edilen bağıntı kullanılarak hesaplandı.

$$X_c \% = \left(1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}} \right) \times 100 \quad (3.4.)$$

Burada $V_{112/300}$ (112) ve (300) yansımaları arasındaki çukurun şiddeti ve I_{300} ise (300) düzlemine ait yansımanın şiddetidir (Landi vd., 2000). XRD verilerinin analizi sonucunda bulunan, yukarıda bahsi geçen tüm parametrelerin hesaplanan değerleri Tablo 3.1’de verildiği gibidir.

Tablo 3.1. Üretilen ve SBF’de bekletilen numunelerin detaylı XRD analizi sonucunda elde edilen parametrelerin değerleri

	Numune	<i>a</i> (nm)	<i>c</i> (nm)	<i>V</i> (nm) ³	<i>X_c</i> %	<i>D</i> ₀₀₂ (nm)	<i>D</i> ₃₀₀ (nm)
SBF Olmadan	CTS1	0.9503	0.6901	0.5397	87.8	37.38	32.87
	CTS2	0.9445	0.6896	0.5327	90.5	36.55	30.79
	CTS3	0.9445	0.6901	0.5331	78.5	30.41	28.66
	CTS4	0.9360	0.6890	0.5227	80.2	30.09	33.40
14 Gün SBF	CTS1	0.9423	0.6890	0.5298	90.0	38.45	29.80
	CTS2	0.9434	0.6906	0.5323	64.8	33.96	30.79
	CTS3	0.9360	0.6885	0.5224	86.4	28.01	28.76
	CTS4	0.9418	0.6875	0.5281	88.0	31.11	33.67
28 Gün SBF	CTS1	0.9445	0.6901	0.5331	86.6	28.20	32.99
	CTS2	0.9462	0.6922	0.5367	87.2	37.72	37.64
	CTS3	0.9440	0.6901	0.5326	76.2	31.59	33.67
	CTS4	0.9423	0.6885	0.5294	87.2	36.88	33.40

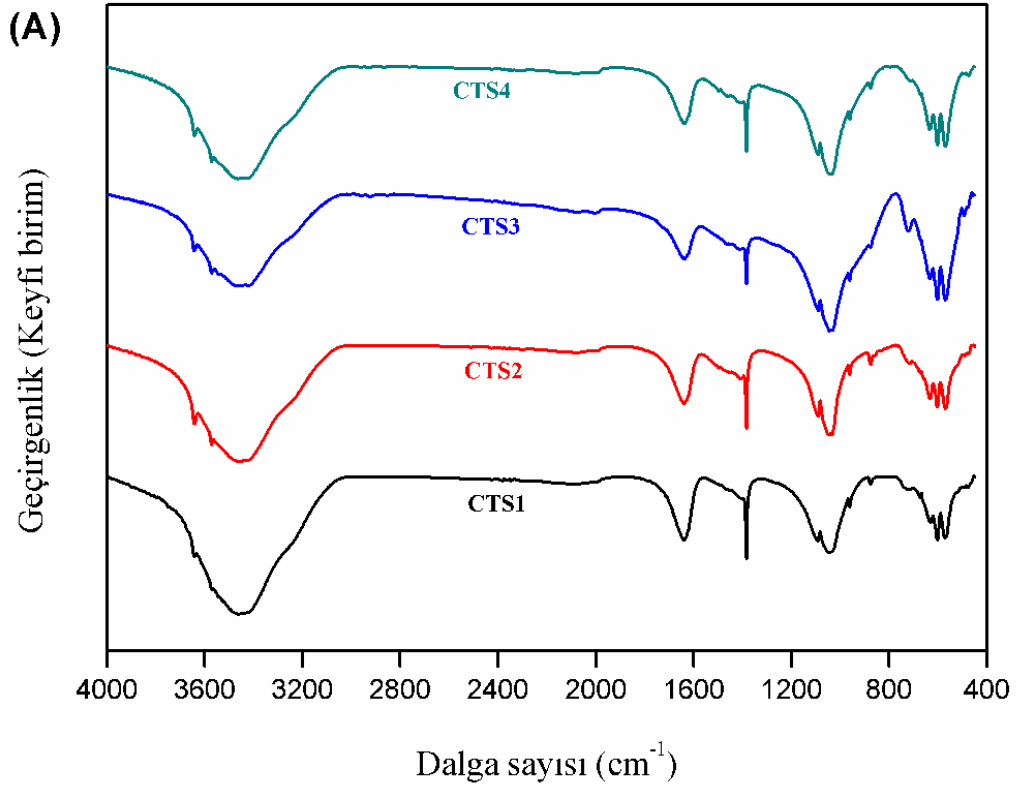
Tablo 3.1’deki sonuçlar incelendiğinde görmekteyiz ki incelenen tüm parametreler hem kitosan miktarından hem de SBF içerisinde kalma sürecinden bariz bir biçimde etkilenebilmektedir. Hem *a* hem de *c* değerinde bu süreçler sonucunda belirgin değişimler gözlenmektedir. Numunelerin kristalleşme yüzdeleri; SBF öncesi % 78,5 ile % 90,5 aralığında iken, 14 gün SBF sonrası % 64,8 - % 90,0 aralığında ve son olarak 28 gün SBF sonrasında ise % 76,2 ile % 87,2 aralığında yer almaktadır. (002) ve (300) düzlemleri için hesaplanan kristal büyüklüğü değerlerine bakılacak olursa; bu değerlerin de açık bir şekilde kitosan katkısı ve SBF’de kalma süresinden etkilendiği görülmektedir. Bu değerler ise 28 nm’den büyük 39 nm’den küçüktür.

Sunulan yüksek lisans tez çalışmasında elde ettiğimiz bu sonuçlar ile Bayraktar ve Tas (1999), Hu vd. (2010), Kaygılı vd. (2014) ve Kaygılı vd. (2016) çalışmalarının sonuçları arasında yüksek bir uyum vardır. Çünkü bu çalışmaların sonuçlarında da SBF sonrasında düzensiz etkiler gözlenmiş, hem *a* hem de *c* değerinde belirgin değişimler meydana gelmiştir. Bir başka deyişle elde ettiğimiz sonuçların literatür ile uyum içinde olduğu açıkça söylenebilir.

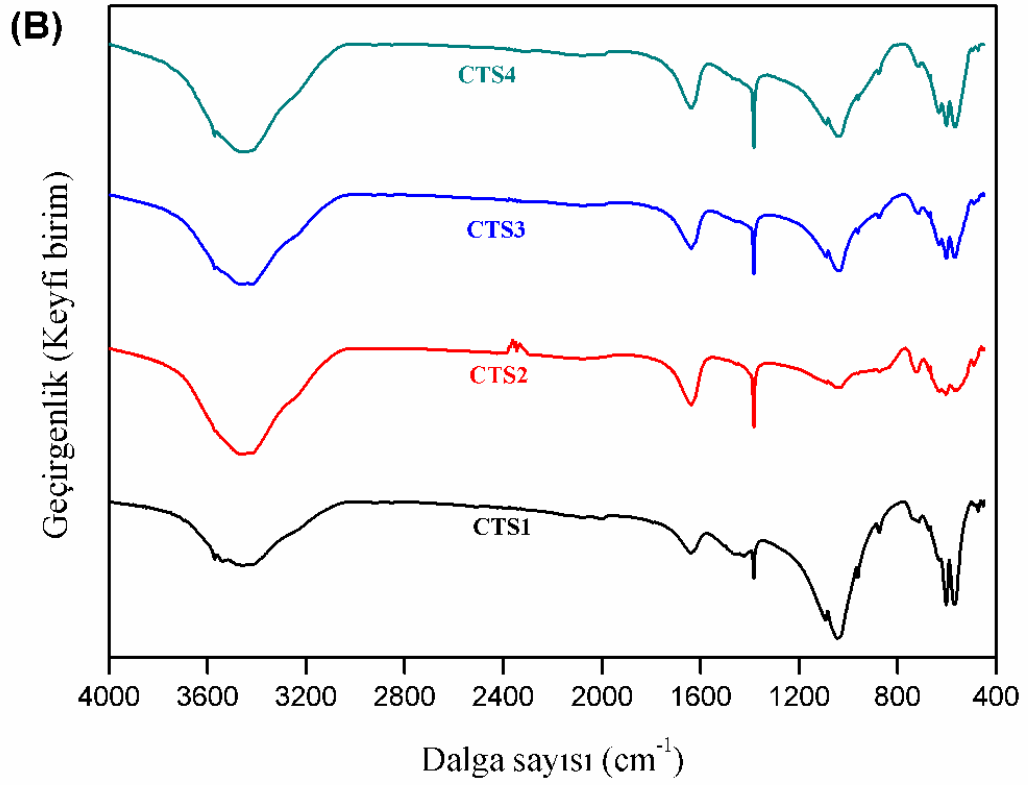
3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Analiz Sonuçları

% 99.56 Ca, % 0.44 Zn ve farklı miktarlarda (0, 3, 6, 9 mL 0.05 M) kitosan içeren HAp numunelerinin SBF öncesi, 14 gün SBF sonrası ve 28 gün SBF sonrası FT-IR spektrumları Şekil 3.4-3.6'de görülmektedir.

Şekil 3.4'de görüldüğü üzere SBF öncesinde tüm numuneler (CTS1, CTS2, CTS3, CTS4) için fosfat (PO_4^{3-}) grubu ile alakalı olan bantlar 470, 570, 602, 961, 1047 ve 1090 cm^{-1} 'de gözlemlendi (Mabilleau vd. 2010; Mansour vd. 2017). Hidroksil (OH) grubuna ait olan karakteristik bantlar ise yine bütün örneklerde 633, 3570 ve 3640 cm^{-1} 'de tespit edildi (Robles-Águila vd. 2017). HAp numunelerinin tamamı için 1384 cm^{-1} 'de gözlenen nitrat (NO_3^-) grubuna ait olan bant ise başlangıç sentez bileşiklerindeki nitrat kalıntılarından kaynaklanmaktadır (Pattanayak vd., 2007). Son olarak 1638 ve 3464 cm^{-1} 'de gözlenen bantlar ise numuneler tarafından adsorbe edilen suya ait karakteristik bantlardır (Wang vd., 2011; Torabinejad vd., 2014).

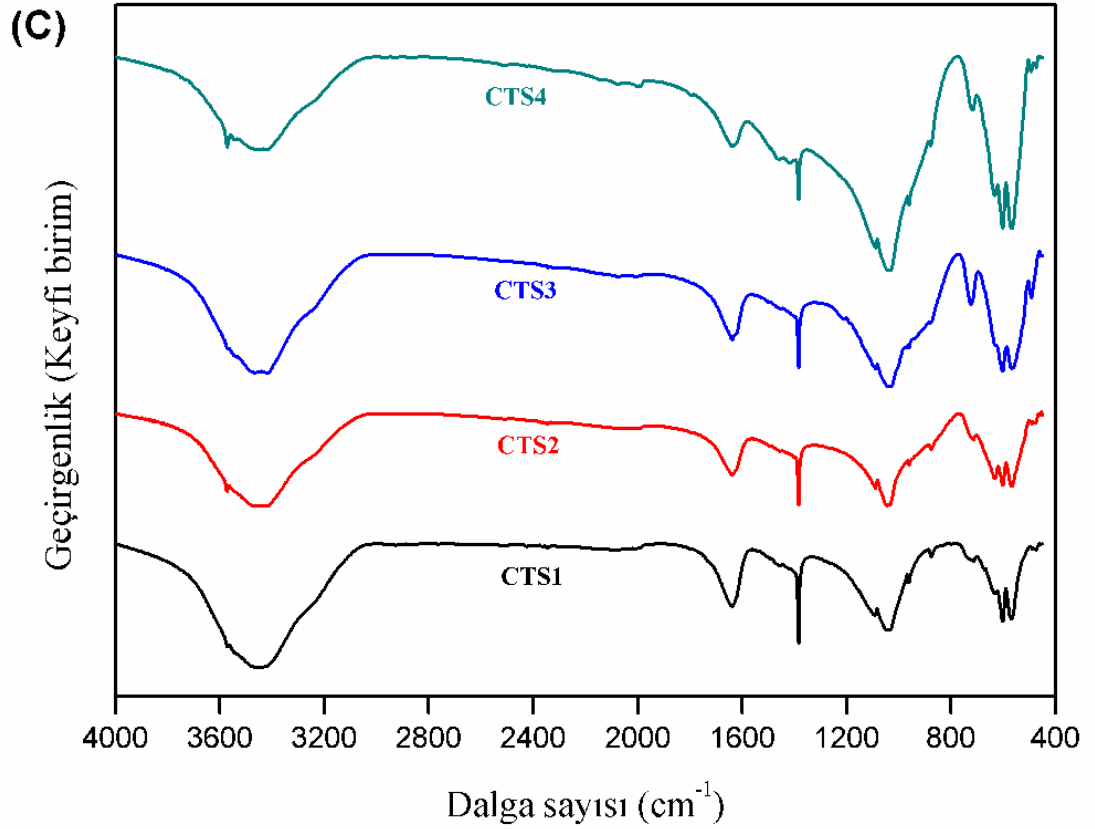


Şekil 3.4. Sentezlenen HAp örneklerinin SBF öncesi FT-IR analiz grafiği.



Şekil 3.5. Sentezlenen HAp örneklerinin 14 gün SBF sonrası FT-IR analiz grafiği.

Şekil 3.5’de 14 gün SBF içerisinde kalan numunelerin FT-IR spektrumları görülmektedir. Buna göre bütün numuneler için fosfat (PO_4^{3-}) grubu ile alakalı olan bantlar 474, 567, 602, 962, 1042 ve 1090 cm^{-1} ’de gözlemlendi (Mabilleau vd. 2010; Mansour vd. 2017). OH grubuna ait karakteristik bantlar ise bütün numunelerde 636 ve 3570 cm^{-1} ’de tespit edildi (Robles-Águila vd. 2017). Yine 1384 cm^{-1} ’de NO_3^- grubuna ait belirlenen karakteristik bant bütün numunelerde mevcuttur (Pattanayak vd. 2007). Son olarak bütün örneklerde tespit edilen 1637 ve 3462 cm^{-1} ’deki bantlar adsorbe edilen H_2O moleküllerine aittir (Wang vd., 2011; Torabinejad vd., 2014).



Şekil 3.6. Sentezlenen HAp örneklerinin 28 gün SBF sonrası FT-IR analiz grafiği.

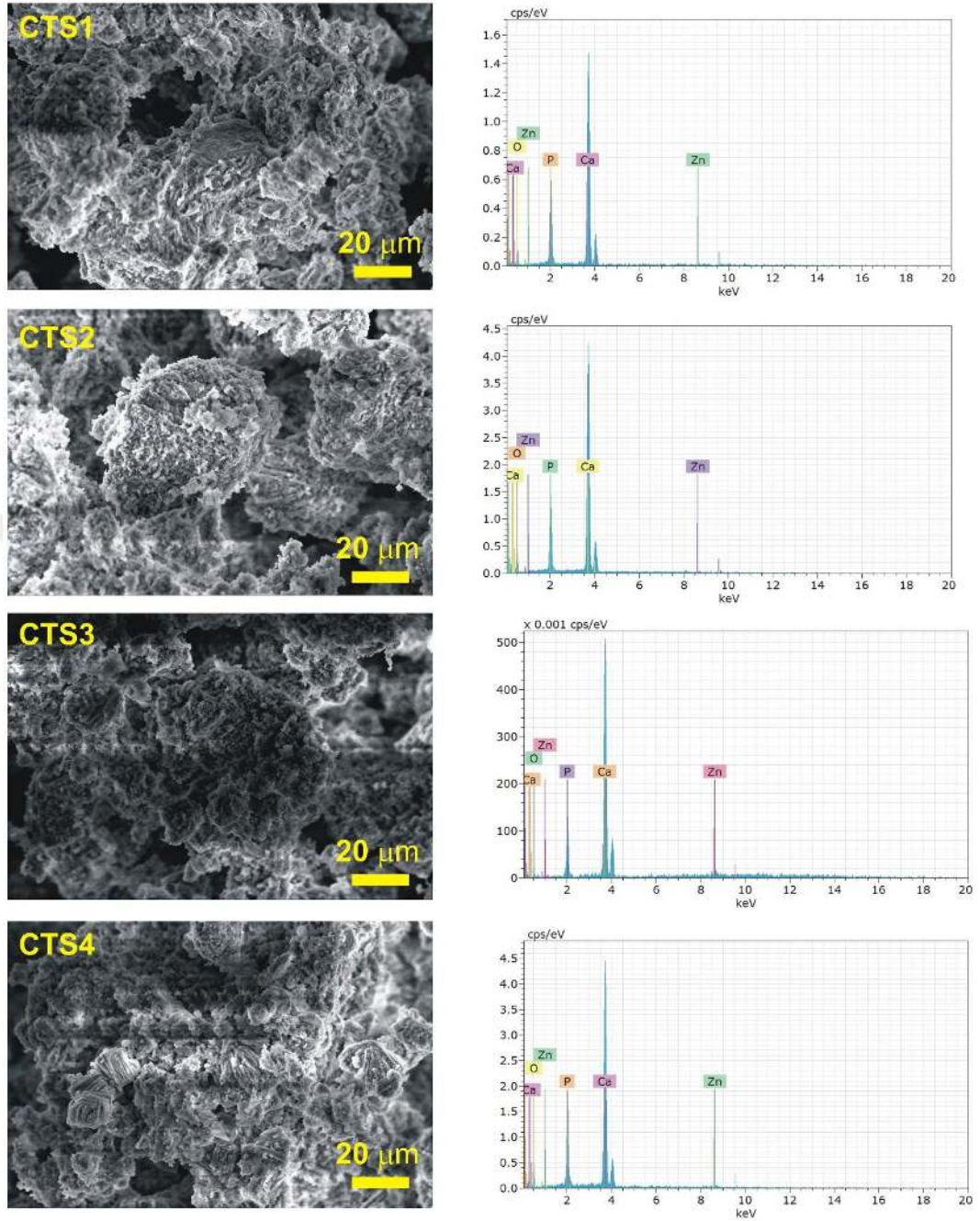
Şekil 3.6’da 28 gün SBF içerisinde kalan numunelerin FT-IR spektrumları yer almaktadır. Bütün numuneler için PO_4^{3-} grubuna ait olan bantlar 474, 569, 502, 961, 1042 ve 1090 cm^{-1} ’de tespit edildi(Mabilleau vd. 2010; Mansour vd. 2017). 633 ve 3570 cm^{-1} ’de bütün numuneler için OH grubuna ait bantlar gözlendi (Robles-Águila vd. 2017). NO_3^- grubuna ait bant yine bütün numuneler için 1384 cm^{-1} ’de belirlendi (Pattanayak vd., 2007). Son olarak 1637 ve 3460 cm^{-1} ’deki bantlar adsorbe edilen H_2O molekülleri için bütün örneklerde tespit edildi (Wang vd., 2011; Torabinejad vd., 2014).

Bütün bu sonuçlar ışığında SBF içerisinde sırasıyla 14 ve 28 gün bekletilen HAp numunelerinin yapay vücut sıvısından herhangi bir etkilenmeye maruz kalmadığı, karakteristik fonksiyonel grup bantlarının bütün örneklerde korunmasından anlaşılmaktadır. Bu durumda ürettiğimiz HAp numunelerinin kararlı bir yapıya sahip oldukları söylenebilir.

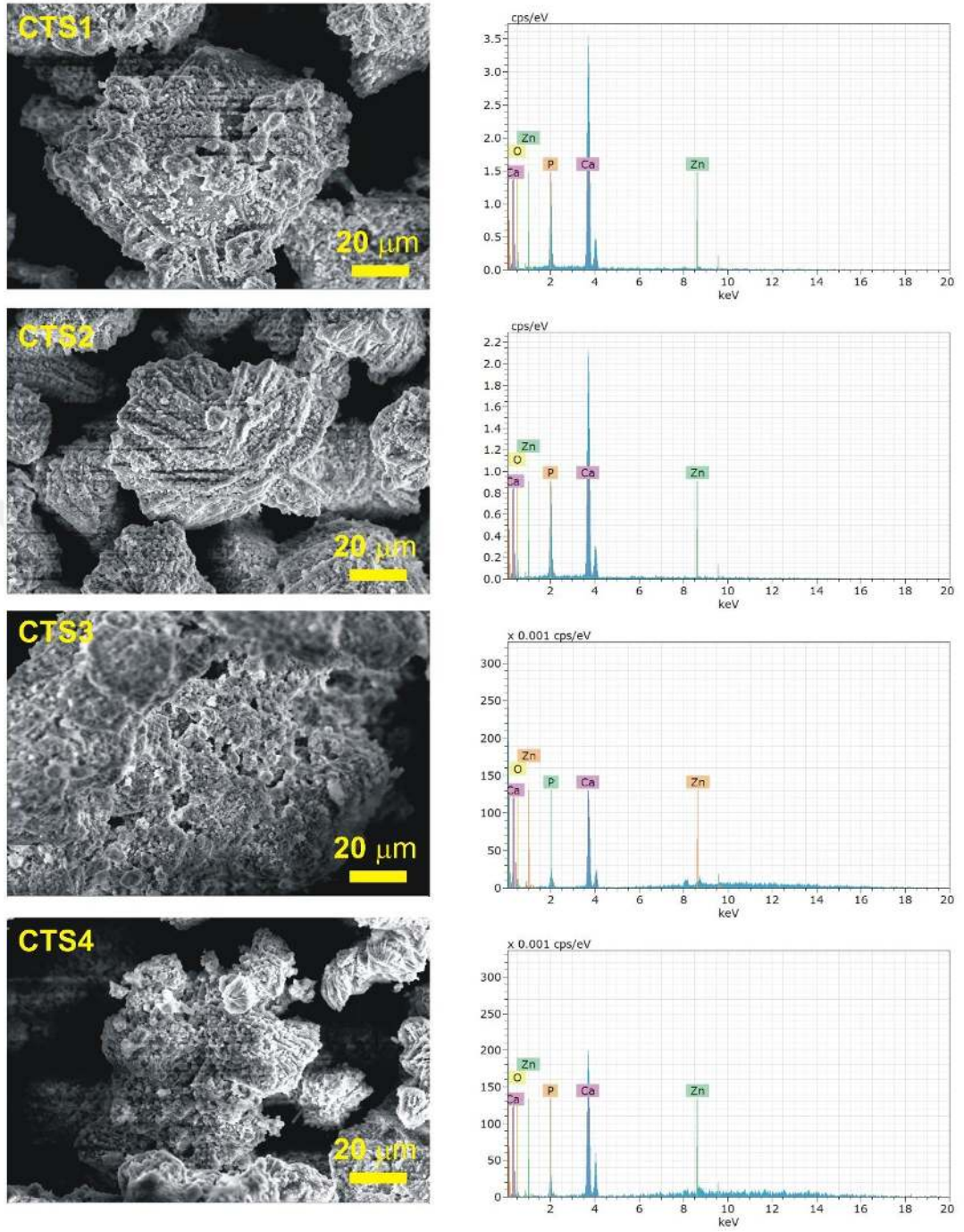
3.3. Morfolojik İncelemeler

Sentezlenen her bir numuneye ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü ve bu görüntü alınan bölgelere ait enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektrumları, Şekil 3.7-3.9’da gösterildiği gibidir. SEM görüntüleri incelendiğinde sentezlenen her bir numunenin hem SBF öncesi hem de SBF sonrasında birbirine yakın gözeneklere sahip küçük tanecikler şeklinde olduğu ve SBF sonrasında da herhangi bir morfolojik değişimin olmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca SEM görüntüsü alınan numunelerin EDX analiz raporları da sentezlenen numunelerin hem SBF öncesinde hem de SBF sonrasında herhangi bir safsızlık taşımadığının kanıtını işaret etmektedir.

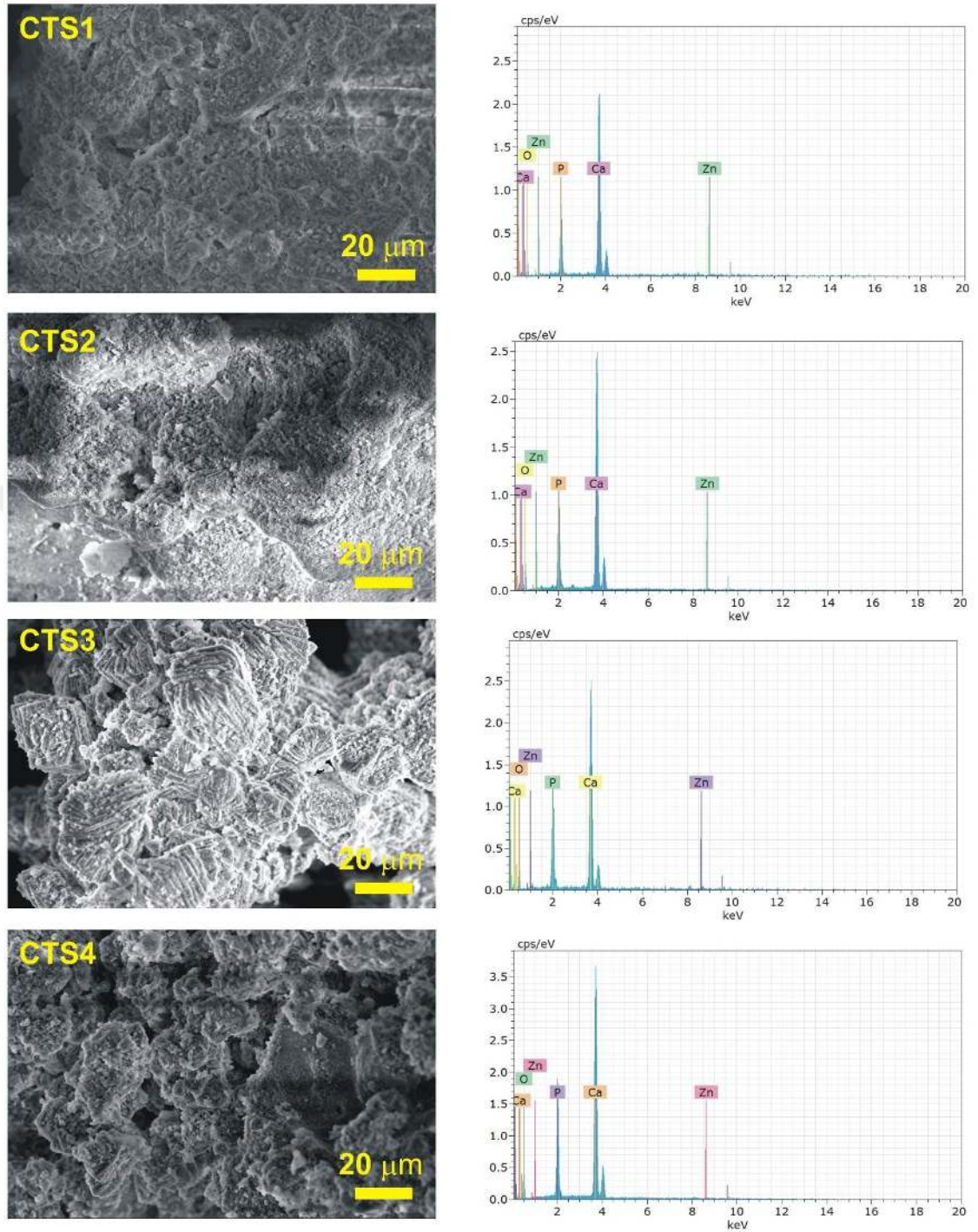




Şekil 3.7. Sentezlenen HAp örneklerinin SBF öncesi SEM görüntüleri ve EDX analiz sonuçları.



Şekil 3.8. Sentezlenen HAp örneklerinin 14 Gün SBF sonrası SEM görüntüleri ve EDX analiz sonuçları.



Şekil 3.9. Sentezlenen HAp örneklerinin 28 Gün SBF sonrası SEM görüntüleri ve EDX analiz sonuçları.

3.4. Antimikrobiyal Aktivite

Herhangi bir malzemenin vücut içine implantasyonu sırasında ve sonrasında karşılaşılan iki önemli problem vardır. Bunlardan birincisi implanta karşı vücutta oluşan inflamatuvar yanıt, ikincisi ise implantın yüzeyine kontamine olan tehlikeli mikroorganizmaların cerrahinin erken safhalarında enfeksiyona neden olmasıdır. Bu iki durumda da cerrahi sonrası enfeksiyon implantın vücuttan uzaklaştırılması için ikinci bir cerrahi operasyona neden olabilmektedir (Sahni vd., 2013). Bu nedenle araştırmacılar artık biyoaktiflik, biyouyumluluk vb. özelliklerin yanında ürettikleri biyomalzemenin antimikrobiyal aktiviteye de sahip olmasını tercih etmektedirler.

Üretilen HAp numunelerine ait antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 5.2’de gösterilmiştir. Buna göre üretilen bütün HAp numunelerinin antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır.

Tablo 3.2. Üretilen HAp örneklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları (mm zone)

Mikroorganizma/Numune	CTS1	CTS2	CTS3	CTS4
<i>Escherichia coli</i>	12	16	16	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	14	13	13
<i>Candida albicans</i>	12	15	15	16

Not: Örneklerin çapı 11 mm

Üretilen numunelerin sahip oldukları antimikrobiyal etkinliğin çinko katkılanmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Çünkü çinko iyonlarının sağladığı antimikrobiyal etkinlik için üç ana mekanizma ileri sürülmüştür: Birincisi, Zn iyonları mikroorganizmada bulunan bazı proteinlere bağlanarak onları etkisiz hale getirebilir. İkincisi, Zn iyonları yapısal değişim ve geçirgenliği sağlayan mikroorganizmaların membranı ile etkileşime girerek onların etkinliğini bozabilir. Üçüncü ve son olarak ise Zn iyonları mikroorganizmanın nükleik asitleriyle etkileşime girerek mikrobiyal çoğalmayı engelleyebilir (Atmaca vd., 1998; Kim vd., 1998; Tank vd., 2014).

Zn katkılanmış HAp örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri ile alakalı çalışmalar incelendiğinde Chung vd., (2005) *Streptococcus mutans* bakterisi üzerinde; Radovanovic vd., (2012) *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* mikroorganizmaları üzerinde; Samani vd., (2013) metisilin dirençli *S. aureus* bakterisi üzerinde; Tank vd., (2014) *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri* bakterileri üzerinde;

Predoi vd., (2017) *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde; Alioui vd., (2019) ise *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* ve *Aspergillus niger* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını tespit etmişlerdir.



4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonunda, sol-jel metoduyla üretilen Zn esaslı ve kitosan katkılı HAp numunelerinin kristal yapısı, fonksiyonel grupları, morfolojileri, antimikrobiyal aktiviteleri incelendi ve bu özelliklere yapay vücut sıvısı içinde bekletilmenin nasıl bir etki yapabileceği araştırıldı. HAp üretiminin maliyet, biyoaktivite, antimikrobiyal aktivite, biyoyumluluk, yapay vücut sıvısı (SBF) içinde bekletilmekten etkilenme durumu vb. özellikleri üretilen HAp numunelerinin karakteristik durumunu belirlediği gibi, bu üretilen HAp numunelerinin tercih edilmesini ve/veya kullanımını da belirlemektedir. Sonuç olarak:

- Sol-jel metodu kullanılarak düşük maliyetli HAp numunelerinin sentezlenmesinin mümkün olduğu belirlenmiştir.
- Kitosan katkısının ve SBF’de bekletilmenin HAp numunelerinin örgü parametresinde ve kristalleşme yüzdesinde değişikliklere neden olduğu saptanmıştır.
- Sentezlenen HAp numunelerinin antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir.
- Üretilen numunelerin seri olarak ve SBF içinde bekletilmelerine rağmen benzer morfolojilere sahip oldukları gözlenmiştir. Numunelerde herhangi bir safsızlık ve/veya kalıntı tespit edilmemiştir.
- Ayrıca üretilen bu HAp numunelerinin *in vivo* ortamda davranışlarının anlaşılması için deney hayvanlarına implante edilerek patolojik etkilerinin incelenmesi ve açıklığa kavuşturulması yeni bir çalışmanın konusu olabilir.

KAYNAKLAR

- Alioui, H., Bouras O.**, 2019, Toward an efficient antibacterial agent Zn- and Mg-doped hydroxyapatite nanopowders, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. **54**, 315-327.
- Arcasoy, A.**, 2002, Çinko ve çinko eksikliği, Ankara Talasemi Derneği Yayınları; 2. Baskı, 1-23.
- Atmaca, A., Gül K., Cicek R.**, 1998, The effect of zinc on microbial growth, *Turk. J. Med. Sci.* **28**, 595–597.
- Ayhan, H.**, 2002, Tıbbın Geleceği, Biyomalzemeler, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Bilim ve Teknik Dergisi, Sıhhiye/Ankara.
- Bayraktar, D., Tas, A.C.**, 1999, Chemical preparation of carbonated calcium hydroxyapatite powders at 37 °C in urea-containing synthetic body fluids. *J Eur Ceram Soc* **19**:2573–2579.
- Carter, B.C., Norton, G.M.**, 2007, *Ceramic Materials Science and Engineering*, Part VII, New York, Springer Science-Business Media, LLC.
- Chung, R.J., Hsieh, M.F., Huang, C.W., Perng, L.H., Wen, H.W.**, 2005, Antimicrobial effects and human gingival biocompatibility of hydroxyapatite sol-gel coatings, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **76B**, 169-178.
- Collins, C.M., Lyne, P.M.**, 1987, *Microbiological methods*, Butterworths & Co Ltd., London.
- Cullity, B.D.**, 1987, *Elements of X-ray Diffraction*, 2nd edition, Addison–Wesley Publishing Company, Massachusetts.
- Er, M.A.**, 2005, SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ Biyoaktif Camlarının Kontrollü Kristalizasyonu, Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Gross, U., Strunz, V.**, 1985, The Interface of Various Glasses and Glass Ceramics with a Bony Implantation Bed, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 251.
- Gümüşderelioglu, M.**, 2002, Biyomalzemeler, Bilim ve Teknik Dergisi, TÜBİTAK, Ankara, Türkiye.
- Hench, L.L.**, 1998, Bioceramics, *J. Am. Cer. Soc.*, **81**, 1705-1728.

- Hu, Y.Y., Rawal, A., Schmidt, R.K.,** 2010, Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:22425–22429.
- İpekoğlu, M.,** 2004, Effects of particle size and sintering parameters on the mechanical properties of hydroxyapatite, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- İpekoğlu, M., Gören, Ş., İpek, M., Gümüşpala, S., Altuntaş, S.,** 2003, Hidroksiapatit üretiminde farklı yöntemlerin karşılaştırılması, Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, Biyomut, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, 27-29 Mayıs.
- Kaygili, O., Keser, S., Kom, M., Bulut, N., Dorozhkin, S.V.,** 2016, The effect of simulating body fluid on the structural properties of hydroxyapatite synthesized in the presence of citric acid. *Prog Biomater* **5**:173–182.
- Kaygili, O., Keser, S., Orainy, R.H., Ates T., Yakuphanoglu, F.,** 2014, In vitro characterization of polyvinyl alcohol assisted hydroxyapatite derived by sol-gel method, *Mater Sci Eng C* **35**:239–244.
- Kim, T.N., Feng, Q.L., Kim, J.O., Wu, J., Wang, H., Chen, G.C., Cui, F.Z.,** 1998, Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) in hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **9**, 129–134.
- Kiremitçi, A.,** 2002, Doğal Polimerler, Hacettepe Üniversitesi, Diş Hekimliği Bölümü Fakültesi, Bilim ve Teknik Dergisi, Ankara.
- Kokubo, T.,** 1991, Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* **12**, 155–163.
- Kong, L.B.,** 2002, Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process, *Journal of Materials Science*, **37**, 1131-1134.
- Kumta, P.N.,** 2005, Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization, *Acta Biomaterialia*, **1**, 65-83.
- Kweh, S.W.K., Khor, K.A., Cheang, P.,** 1999, The production and characterization of hydroxyapatite (HA) powders, *Journal of Materials Processing Technology*, **89**, 373-377.
- Landi, E., Tampieri, A., Celotti, G., Sprio, S.,** 2000, Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites, *J. Eur. Ceram. Soc.*, **20**, 2377–2387.
- Hench, L.L., Wilson, J.,** 1993, An introduction to bioceramics-Vol 1, World Scientific Publishing Co., **1-25**; 139-189.

- Lee, H.B., Khang, G., Lee, J.H.,** 2000, Polymeric Biomaterials, in: Joseph D. Bronzino (Ed.) The Biomedical Engineering Handbook, 2nd Ed. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Lehmann, J.,** 1996, Kohlenhydrate: Chemie und Biologie, Thieme, Stuttgart ISBN 3-13-532-902-X (available in German only).
- Ma, J., Wong, H., Kong, L.B., Peng, K.W.,** 2003, Biomimetic Processing of Nanocrystallite Bioactive Apatite Coating on Titanium. *Nanotechnology*, **14**, 619-623.
- Mabilleau, G., Filmon, R., Petrov, P.K., Baslé, M.F., Sabokbar, A., Chappard, D.,** 2010, Cobalt, chromium and nickel affect hydroxyapatite crystal growth in vitro, *Acta Biomaterialia*, **6**, 1555–1560.
- Mansour, S.F., S., Ahmed, M.K.,** 2017, Physico-mechanical and morphological features of zirconia substituted hydroxyapatite nano crystals, *Scientific Reports*, **7**, 1-21.
- Meyers, S.P., No, H.K., Lee, K.S.,** 1989, Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste, *J. Agric. Food Chem.* **37**, 575.
- Nagai, H., Nishimura, Y.,** 1980, Hydroxyapatite, ceramic material and process for preparing thereof, US Patent 4330514.
- Paital, S.R., Dahotre, N.B.,** 2009, Calcium phosphate coatings for bioimplant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Materials Science and Engineering*, **R66**, 1-70.
- Park, J.B., Kon Kim, Y.,** 2000, Metallic Biomaterials, in: Joseph D. Bronzino (Ed.), The Biomedical Engineering Handbook, 2nd ed., , Boca Raton, FL, CRC Press LLC.
- Pattanayak, D.K., Dash, R., Prasad, R.C., Rao, B.T., Mohan,** 2007, Synthesis and sintered properties evaluation of calcium phosphate ceramics. *Mater Sci Eng C* **27**:684–690.
- Pielichowska, K., Blazewicz, S.,** 2010, Bioactive Polymer/ Hydroxyapatite (Nano) Composites for Bone Tissue Regeneration. *Advances in Polymer Science*, Springer Berlin Heidelberg, **232**, 97- 207.
- Predoi, D., Iconaru, S.L., Deniaud, A., Chevallet, M., Michaud-Soret, I., Buton, N., Prodan, A.M.,** 2017, Textural, structural and biological evaluation of hydroxyapatite doped zinc at low concentrations. *Materials*. **10**, 1-17.

- Qiu, Q.Q., Ducheyne, P., Ayyaswamy, P.S.,** 2000, New Bioactive, Degradable Composite Microspheres as Tissue Engineering Substrates, *J. Biomed. Mater. Res.*, **52-1**, 66-76.
- Radovanovic, Z., Veljovic, D., Jokic, B., Dimitrijevic, S., Bogdanovic, G., Kojic, V., Petrovic, R., Janackovic, D.,** 2012, Biocompatibility and microbial activity of zinc (II)-doped hydroxyapatite, synthesized by a hydrothermal method. *Journal of Serbian Chemical Society.* **77**, 1787-1798.
- Robles-Águila, M.J., Reyes-Avendaño, J.A., Mendoza, M.E.,** 2017, Structural analysis of metal-doped (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) calcium hydroxyapatite synthesized by a sol-gel microwave-assisted method, *Ceramics International*, **43**, 12705-12709.
- Rostan, E.F., DeBuys, H.V., Madey, D.L.,** 2002, Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *Int J of Dermatol*; **4**: 606-11.
- Sahni, G., Gopinath, P., Jeevanandam, P.,** 2013, A novel thermal decomposition approach to synthesize hydroxyapatite-silver nanocomposites and their antibacterial action against GFP-expressing antibiotic resistant *E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **103**, 441–447.
- Samani, S., Hossainipour, S.M., Tamizifar, M., Rezaic, H.R.,** 2013, In vitro antibacterial evaluation of sol-gel-derived Zn-, Ag-, and (Zn+Ag)-doped hydroxyapatite coatings against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* **101A**, 222-230.
- Saner, G., Neyzi, O., Ertuğrul, T.,** 2002, Mikroelementler (Çinko). *Pediatrici*; 1. Cilt, 3. Baskı, İstanbul, 174-75.
- Tank, K.P., Chudasama, K.S., Thaker, V.S., Joshi, M.J.,** 2014, Pure and zinc doped nano-hydroxyapatite: Synthesis, characterization, antimicrobial and hemolytic studies. *Journal of Crystal Growth.* **401**, 474-479.
- Torabinejad, B., Mohammadi-Rovshandeh, J., Davachi, S.M., Zamanian, A.,** 2014, Synthesis and characterization of nanocomposite scaffolds based on triblock copolymer of L-lactide, ϵ -caprolactone and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C* **42**:199–210.
- Wang, H., Sun, K., Li, A., Wang, W., Chui, P.,** 2011, Size-controlled synthesis and characterization of fluorapatite nanocrystals in the presence of gelatin, *Powder Technol*, **209**:9–14.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı

KİŞİSEL BİLGİLER

HARUN EFE

ADRES : Sultanuşağı Köyü Cadde Boyu Mezrası No: 17 Kat: 2
Merkez/ELAZIĞ

TELEFON : +90 (532 448 38 92)

EPOSTA : hrnharunefe@gmail.com

DOĞUM

BASKİL / 17.10.1990

YERİ/TARİHİ:

MEDENİ HALİ: Bekar

EĞİTİM BİLGİLERİ

LİSANSÜSTÜ (2016-Devam Ediyor), Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoteknoloji, ELAZIĞ

LİSANS : 2014, ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ, Fen Fakültesi Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü ERZURUM

LİSE : 2007, Hıdır Sever Lisesi, ELAZIĞ

İŞ DENEYİMİ

BİLDİĞİ YABANCI DİLLER

İngilizce (B1)

İLGİLENDİĞİ DİĞER BİLİMLER

✓ Biyoteknoloji, Tarım ve Hayvancılık