T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALSİYUM FOSFAT VE YUMURTA KABUK ZARI SUDA ERİYEBİLİR PROTEİNİ İLE KAPLANAN TİTANYUM VİDALARIN OSSEOİNTEGRASYONUNUN HİSTOLOJİK, HİSTOMORFOMETRİK VE MİKROTOMOGRAFİK YÖNTEMLERLE İN VİVO TAVŞAN MODELİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet Bahadır İLİK

DOKTORA TEZİ

AĞIZ DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ercan DURMUŞ

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALSİYUM FOSFAT VE YUMURTA KABUK ZARI SUDA ERİYEBİLİR PROTEİNİ İLE KAPLANAN TİTANYUM VİDALARIN OSSEOİNTEGRASYONUNUN HİSTOLOJİK, HİSTOMORFOMETRİK VE MİKROTOMOGRAFİK YÖNTEMLERLE İN VİVO TAVŞAN MODELİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet Bahadır İLİK

DOKTORA TEZİ

AĞIZ DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ercan DURMUŞ

İkinci Danışman
Prof. Dr. İlhami ÇELİK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, tarafından 14102008 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

ÖNSÖZ

Hayatımın her anında yanımda olan, canımdan çok sevdiğim, maddi ve manesi desteklerini hiç çekinmeden seferber eden anneme, babama ve kardeşime;

Doktora tezimin hazırlanmasında beni yönlendiren ve katkılarını esirgemeyen çok değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Ercan DURMUŞ ve Prof. Dr. İlhami ÇELİK' e;

Projemizi desteklediği için Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne;

Çalışmamda yer alan örneklerin histolojik incelenmesinde büyük emeği olan, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İlhami ÇELİK ve kürsü ekibine;

Örneklerin mikrotomografik yöntemle incelenmesinde bana yardımcı olan ODTÜ Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Mükemmeliyet Merkezi' ne;

İstatistiksel incelemeler sırasında yardımcı olan Araştırma Görevlisi Yener ÜNAL' a;

Tez çalışmam boyunca sabırla bana yardımcı olan değerli bölüm hocalarıma, mesai arkadaşlarıma, hemşire ve personelimize;

En içten duygularımla teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR vi

1. GİRİŞ 1

1.1. Kemik-Dental İmplant Bağlantısı 2

1.1.1. Osseointegrasyon 3

1.1.2. Fibroosseöz Retansiyon Teorisi 6

1.1.3. Biyointegrasyon 8

1.2. Biyomateryaller ve Fizikokimyasal Özellikleri 9

1.3. Kalsiyum Fosfat Seramiklerinin Yapı ve Özellikleri 11

1.3.1. Mono Kalsiyum Fosfat Monohidrat (MCPM) ve Mono Kalsiyum Fosfat Anhidröz (MCPA) 14

1.3.2. Dikalsiyum Fosfat Dihidrat (DCPD veya Braşit) 14

1.3.3. Dikalsiyum Fosfat Anhidrat (DCPA veya Monetit) 15

1.3.4. Oktakalsiyum Fosfat (OCP) 16

1.3.5. β-Trikalsiyum Fosfat (β-TCP) 17

1.3.6. α-Trikalsiyum Fosfat (α-TCP) 18

1.3.7. Amorf Kalsiyum Fosfat (ACP) 19

1.3.8. Kalsiyum-Yetersiz Hidroksiapatit (CDHA) 19

1.3.9. Hidroksiapatit (HA) 20

1.3.10. Floroapatit (FA) 21

1.3.11. Tetrakalsiyum Fosfat (TTCP) 21

1.4. Kalsiyum Fosfat Seramiklerinin Çözünme Özellikleri 22

1.5. Kalsiyum Fosfat Seramikleriyle Kaplama Teknikleri 23

1.5.1. Plazma Sprey Tekniği 24

1.5.2. Lazer Ablasyon Tekniği 26

1.5.3. İyon Demeti Tekniği 28
1.5.4. Sıçratma Tekniği 29
1.5.5. Elektrokimyasal Depozisyon Tekniği 31
1.5.6. Elektrosprey Kaplama Tekniği 33
1.5.7. Biyomimetik Kaplama Tekniği 34
1.6. Kalsiyum Fosfat Kaplamaların Karakterizasyon Teknikleri 44
1.6.1.Foton Temelli Yöntemler 44
1.6.2. Mikroskobik Yöntemler 47
1.6.3. Histolojik Yöntemler 50
1.6.4. Mikrotomografi Yöntemi 52
1.7. Kanatlı Hayvan Yumurtası Temelli Ürünler 56
1.7.1. Yumurta Kabuğu 56
1.7.2. Yumurta Kabuğu Zarı (ESM) ve Zar Proteini (SEP) 58
2. GEREÇ ve YÖNTEM 66
2.1. Grade 5 Ti Vidaların Kaplama Öncesi Yüzey Aktifleştirme İşlemleri 66
2.2. Yapay Beden Sıvısının (SBF 10X) Hazırlanması 66
2.3. Kaplama Yüzeyinin Özelliklerinin Belirlenmesi 69
2.4. Yumurta Kabuk Zarı Proteinlerinin Elde Edilmesi ve Kalsiyum Fosfat Kaplanan Vida Yüzeyine Yumurta Kabuk Zarı Proteini Adzorpsiyonu 70
2.5. Deney Hayvanları 73
2.6. Cerrahi İşlemler 74
2.7. Mikrotomografik Değerlendirme 75
2.8. Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme 78
3. BULGULAR 80

3.1. Kalsiyum Fosfat Kaplama Yüzeyine ait Tarama Elektron Mikroskobu ve EDX Analizi Bulguları 80

3.2. Kalsiyum Fosfat Kaplama Yüzeyi X Işını Kırınım Analizi Bulguları 85

3.3. Mikrotomografi İncelemesi Bulguları 86

3.3.1. Kemik Hacmi/Toplam Hacim 87

3.3.2. Kemik Yüzey Yoğunluğu 87

3.3.3. Trabekül Sayısı 88

3.3.4. Trabeküler Boşluk 88

3.3.5. Trabeküler Kalınlık 89

3.3.6. Kemik Mineral Yoğunluğu 89

3.4. Histolojik ve Histomorfometrik Bulgular ve Verilerin İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları 90

3.4.1. Kontrol Grubu 90

3.4.2. Deney Grubu 91

3.4.3. Deney ve Kontrol Gruplarının Yeni Kemik Oluşum Yüzdeleri 92

3.4.4. Deney ve Kontrol Gruplarının Osteoid Doku Yüzdeleri 93

3.4.5. Deney ve Kontrol Gruplarının Bağ Dokusu Yüzdeleri 93

3.4.6. Deney ve Kontrol Gruplarının Kan Damarı Yüzdeleri 94

4. TARTIŞMA 95

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 116

6. KAYNAKLAR 118

7. EKLER 138

EK A: Etik Kurul Raporu 138

8. ÖZGEÇMİŞ 139

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACP: Amorf kalsiyum fosfat

A. Actinomycetemcommitans: Actinobacillus Actinomycetemcommitans

AHA: Amorf hidroksiapatit

α-TCP: α-Trikalsiyum fosfat

B. Frosthytus: Bakteroides Frosthytus

β-CPP: β-Kalsiyum pirofosfat

β-TCP: β-Trikalsiyum fosfat

BMP: Kemik morfojenik proteini "Bone Morphogenic Protein"

Ca/P: Kalsiyum/Fosfat

CDHA: Kalsiyum yetersiz hidroksiapatit "Calcium deficient hydroxyapatite"

DC: Doğru akım "Direct current"

DCPA: Dikalsiyum fosfat anhidrat "Monetit"

DCPD: Dikalsiyum fosfat dihidrat "Braşit"

Dk: Dakika

Dz: Dış zar

ECM: Ekstraselüler matriks

EDX: X Işınları saçılım analizi

FA: Floroapatit

FTIR: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi

GDF-5: Growth and differentiation factor-5

HA: Hidroksiapatit

IR: Kızılötesi spektrum

İÜ/mg: İnternasyonel ünite/miligram

İz: İç zar

keV: Kiloelektron volt

Kh: Kemik hacmi “Bone volume”

Kh/Th: Kemik hacmi yoğunluğu (Kemik hacmi/Toplam hacim)

KMY: Kemik mineral yoğunluğu “Bone mineral density”

Ky: Kemik yüzeyi “Bone surface”

Ky/Th: Kemik yüzey yoğunluğu (Kemik Yüzeyi/Toplam hacim)

MCPA: Mono kalsiyum fosfat anhidrat

MCPM: Mono kalsiyum fosfat monohidrat

mL: Mililitre

mM: Milimol

nm: Nanometre

OCP: Oktakalsiyum fosfat

P. Gingivalis: Porphyromonas gingivalis

PLA: Polilaktik asit

PCL: Poli ε-kaprolakton

PLGA: Polilaktik koglikolik asit

RF: Radyofrekans

rhBMP-2: Rekombinant insan morfojenik proteini-2

rhFGF-2: Rekombinant fibroblast büyüme faktörü-2

S. Aureus: Staphylococcus Aureus

SEM: Scanning electron microscope (Tarama elektron mikroskobu)

SiC: Silisyum karbit

SLA: Sandblasted and acid-etched (Kumlanmış ve asitle pürüzlendirilmiş)

Sr: Stronsiyum elementi

SS: Standart sapma

TEM: Transmission electron microscope (Geçirim elektron mikroskobu)

TTCP: Tetrakalsiyum fosfat

Tv: Toplam hacim “Total Volume”

µm: Mikrometre

WDS: Dalga boyu dağılım spektrometresi

XRD: X-Işını kırınım

VEGF: Vazoendoteliyal büyüme faktörü

YBS: Yapay beden sıvısı (Simulated Body Fluid)

YBS 1,5X: İyon konsantrasyonu 1,5 katına çıkartılmış yapay beden sıvısı

YBS 5X: İyon konsantrasyonu 5 katına çıkartılmış yapay beden sıvısı

YBS 10X: İyon konsantrasyonu 10 katına çıkartılmış yapay beden sıvısı

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kalsiyum Fosfat ve Yumurta Kabuk Zarı Suda Eriyebilir Proteini ile Kaplanan Titanyum Vidaların Osseointegrasyonunun Histolojik, Histomorfometrik ve Mikrotomografik Yöntemlerle İn Vivo Tavşan Modelinde Değerlendirilmesi

Mehmet Bahadır İLİK
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2015

Bu çalışmanın amacı kalsiyum fosfat ve yumurta kabuk zarı suda eriyebilir proteini ile kaplanan titanyum vidaların biyouyum ve osseointegrasyon düzeyinin postoperatif altıncı haftada değerlendirilmesidir.

Çalışmada aynı uzunluk ve çaptaki 20 titanyum vida kullanılmıştır. Bütün vidalar Yeni Zelanda tavşanlarına ait tibiaların, anteromedial bölgesine monokortikal olarak yerleştirilmiştir. Le Forte® (20-MN-006) marka vidalar iki ayrı gruba ayrılmıştır; kaplama yapılmayan vidalar kontrol grubu (n=10), kaplama yapılan vidalar (n=10) ise deney grubudur. Deney grubuna ait vidalar YBS 10X vasıtasıyla biyomimetik kaplama yöntemi uygulanarak, kalsiyum fosfat tabakası ve gluteraldehit çapraz bağıyla yumurta kabuk zarı suda eriyebilir proteiniyle kaplanmıştır. Tavşanlar postoperatif altıncı haftada sakrifiye edilmiştir. Vida çevresi doku histolojik, histomorfometrik ve mikrotomografik yöntemlerle incelenmiştir. İstatistiksel analizler için Mann Whitney U testi uygulanmıştır.

Çalışma sonunda, mikrotomografik değerlendirmede, kaplanan vidaların trabekül sayısı ve kemik yüzey yoğunluğunun ($p<0,05$) istatistiksel açıdan önemli derecede arttırdığı gösterilmiştir. Histolojik ve histomorfometrik değerlendirme ise, deney grubuna ait vida çevresi dokuda, kan damarı yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0,05$) arttığı ortaya koyulmuştur. Diğer parametrelerde ise anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$).

Bu çalışmanın sonuçları; hazırlanan kompozit materyalle kaplanan vidaların biyouyumlu olduğunu, immün ya da alerjik reaksiyona sebebiyet vermediğini göstermektedir. Vida çevresindeki artmış trabekül sayısı, kaplama yüzeyinin osseointegrasyon üzerindeki etkisinin olumlu yönde olabileceğini göstermektedir. Deney grubundaki artmış kemik yüzey yoğunluğu ise, vida çevresindeki kemiğin mekanik özelliklerinin olumlu yönde etkilenmesinden kaynaklı olabilir.

Anahtar Sözcükler: Biyomimetik kaplama; mikrotomografi; osseointegrasyon; YBS 10X; yumurta kabuk zarı proteini

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Histologic, Histomorphometric and Microtomographic Evaluation of The Osseointegration of Calcium Phosphate and Water Soluble Egg Shell Membrane Protein Coated Titanium Screws by In Vivo Assesment in the Rabbit Model.

Mehmet Bahadır İLİK
Department of Oral and Maxillofacial Surgery

PhD THESIS / KONYA 2015

The aim of this study was to evaluate the effect of calcium phosphate and water soluble egg shell membrane protein coated Ti screws on biocompatibility and osseointegration after six weeks postoperatively.

Twenty Ti screws that were with similar length and diameter were used in the study. All screws were placed monocortically to anteromedial region of New Zealand rabbit tibiae. The screws Le Forte® (20-MN-006) were divided into two groups; uncoated (n=10) as control group and Ti-coated (n=10) as test group. In the test group, Ti screws were coated with calcium phosphate layer via SBF 10X biomimetic coating and crosslinked water soluble eggshell membrane protein with gluteraldehide. All rabbits were sacrificed postoperatively after six weeks of screw placement. Histologic, histomorphometric and microtomographic evaluation of peri-screw tissue were performed. Mann Whitney U test was used for the statistical analysis.

Results of the microtomographic assessment, demonstrated that Ti-coated screws significantly increased bone trabecula number and bone surface density ($p<0,05$). Histologic and histomorphometric assessments have revealed that, increase in the blood vessel tissue ratio around the peri-screw tissue was statically significant ($p<0,05$). No significant differences ($p>0,05$) were seen in the other parameters.

Based on the results of this study it was concluded that Ti-coated screws were biocompatible and did not cause immune or allergic reactions. Increased trabecular number around Ti-coated screws might show that coating process have positive impact on screw osseointegration. Increased bone surface density might be arisen from positively affected mechanic properties of peri-screw bone tissue.

Key Words: Biomimetic coating; egg shell membrane protein; micro CT; osseointegration; SBF 10X

1. GİRİŞ

Diş hekimliğinde kullanılan biyomateryallerin ve çevre dokuların niteliklerinin daha iyi anlaşılması ve kullanımda olan implantların uzun dönem sonuçlarını içeren makalelerin sonuçları, oral implantoloji alanında kayda değer gelişmeleri ortaya koymaktadır (James 1987). Tedavi sonrasında normal kontur, fonksiyon, konfor, estetik ve fonasyonun sağlanması günümüz diş hekimliğinin en önemli amacıdır. Bu nedenle farklı implant materyalleri, dizaynları ve yerleştirilme teknikleri geliştirilerek; uygulama sonrası daha başarılı ve tahmin edilebilir sonuçlara ulaşılması amaçlanmaktadır (Misch 1999).

Titanyum reaktif özellikte bir metaldir; hava veya sıvı elektrolit ortamda yüzeyinde dayanıklı bir oksit film tabakası oluşur. Yerleştirildiği fizyolojik ortamda meydana gelen korozyonla malzemeden salınan koroziv ürünler canlıya ait organik moleküllere afinite göstermezler. Bu bağlamda titanyum yüzeylere karşı istenmeyen lokal ya da sistemik reaksiyonlar rapor edilmemiştir (Steinemann 1998).

Kemikteki vaskülarizasyonun mikroskobik yöntemlerle incelenmesinin amaçlandığı ve tavşanlar üzerinde, 1950'li yıllarda yapılan bir çalışmada, saf titanyum yüzeylere kemiğin hücresel elemanlarının tutunduğu görülmüştür (Branemark 1959). Sahip olduğu bu özellik; araştırmacılara, kemik içine yerleştirilebilen titanyum implantlar üzerinde çalışma konusunda ilham kaynağı olmuştur. Bu doğrultuda geçmişten günümüze transosseöz, subperiosteal ve endosteal olarak uygulanabilen titanyumdan implant materyalleri geliştirilmiştir (James 1987). Takip eden dönemde ise endosteal (kemik içi) implantların klinik başarısını arttırabilmek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla dental implantların kimyasal kompozisyonlarında değişiklikler (Buser ve ark 2004), yüzey pürüzlülüğü arttırma işlemleri (Wennerberg ve ark 1995) ve kemiğe tutunmayı arttırdığı düşünülen biyoaktif materyallerle kaplama yöntemleri (Barrere ve ark 2003a) gündeme gelmiştir.

Cam seramikler (Gross ve ark 1981) ve kalsiyum fosfat seramikleri (Kamitakahara ve ark 2006) biyoaktif materyallere örnek olarak gösterilebilirler. Günümüzde tıp alanında monetit, braşit, trikalsiyum fosfat, oktakalsiyum fosfat ve hidroksiapatit gibi kalsiyum fosfat seramikleri kullanılmaktadır (de Groot ve ark 1998). Bu materyallerin alveoler kemik augmentasyonlarında (Kamakura ve ark 1996)

ve maksillofasiyal rekonstrüksiyonlarda (Francis ve ark 2012) kullanılabilen formları bulunmaktadır.

Ancak kalsiyum fosfat seramikleri sahip oldukları zayıf mekanik özelliklerinden dolayı, fizyolojik yükler altında zarar görmektedirler. Bu durumu bertaraf etmek ve iskeletsel kuvvetlere maruz kalan bölgelerde de bu materyallerden yararlanabilmek amacıyla, yüzeylerine kalsiyum fosfat kaplanmış metal ortopedik protezlerin kullanımı gündeme gelmiştir (Thomas ve ark 1989).

Bu sebeple araştırmacılar çeşitli kalsiyum fosfat kaplama yöntemleri geliştirmiştir. Kullanılan her tekniğin avantaj ve dezavantajları bulunmakla beraber, günümüzde ticari alanda dental implantların ve ortopedik metal protezlerin kalsiyum fosfatla kaplanmasında yaygın olarak plazma sprey tekniği kullanılmaktadır (Herman 1988).

Çözünebilir yumurta kabuk zarı proteini ise yumurta kabuğu zarının performik asit ile oksidasyonu ve pepsinde çözülmesiyle elde edilebilmektedir (Takahashi ve Hattori 1994).Takahashi ve Hattori'nin yaptıkları ilk çalışmanın devamı niteliğindeki başka bir çalışmada (Takahashi ve ark 1996) ise elde edilen çözünebilir yumurta kabuk zarı proteininin, kollagen matriks rekonstrüksiyonunda düzenleyici bir materyal olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda yumurta kabuk zarı proteinin, matriks oluşumunu hızlandırdığı, çeşitli solventler karşısında kollagen matriks dayanıklılığını arttırdığı ve matriksin denatürasyona uğrama sıcaklığını yükselttiği belirtilmektedir. Bu durum; çözünebilir yumurta kabuk zarı proteininin, kollagen matriks yapılarının fiziksel özelliklerini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir.

1.1. Kemik-Dental İmplant Bağlantısı

Yapılan araştırmalar sonucunda edinilen deneyimlerin ışığında, canlı kemik dokusu ile dental implantlar arasında meydana gelen rijit bağlantı' Osseointegrasyon' olarak isimlendirilmektedir.

Ancak literatür incelendiğinde, dental implantların canlı kemikle bağlantısı "1-Osseointegrasyon, 2-Fibröz retansiyon, 3-Biyointegrasyon" olarak 3 ayrı grupta incelenmektedir (Misch 1999).

1.1.1. Osseointegrasyon

Osseointegrasyon "Canlı kemikle okluzal kuvvetler altındaki implant yüzeyi arasında oluşan direk yapısal ve fonksiyonel bağlantı" olarak tarif edilmektedir (Branemark ve ark 1977). Klinik olarak ise direk olarak bağlantı halinde olduğu kemik içerisinde stabil halde bulunan implantlar osseointegre olmuş olarak kabul edilmektedir (Branemark 1983). Ayrıca kemik içerisine yerleştirilen ve 1 ila 500 gr' lık dikey ve yatay yönde uygulanan kuvvetler karşısında mobilite gözlenmeyen implantların, klinik olarak rijit fiksasyonlarının sağlandığı kabul edilmektedir (Misch 1999).

Adell ve ark (1981)' nın yaptığı 15 yıllık klinik çalışmada maksilla ve mandibulada kemiğe osseointegre olmuş dental implantların klinik olarak başarılı olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada, yerleştirilen dental implantların uygun düzeyde osseointegre olabilmeleri için alt çenede en az 3 ila 4 ay, üst çenede ise en az 5 ila 6 ay beklenmesi ve uygun cerrahi yaklaşıma sadık kalınması gerektiği vurgulanmıştır.

Branemark ve ark (1969)' nın köpekler üzerinde yaptığı bir çalışmada ise köpeklerin alt ve üst çenelerine yerleştirilen kemik içi implantların akıbeti üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmaya göre uzun dönem klinik başarı sağlanabilmesi için

1- İnert, mekanik ve kimyasal olarak temiz implant kullanılması,

2- İmplantın etrafında yeterli kemik oluşacak şekilde uygun boyutta olması,

3- İmplantın yerleştirilmesinde atravmatik çalışılması,

4- Postoperatif dönemde yumuşak doku kesilerinin iyileşmesine kadar geçen sürede yaranın primer olarak kapatılması ve oral kaviteden izole edilmesi,

5- Yerleştirilen implantın protetik rehabilitasyonunun sağlanması ve bunun sonucunda kemikte remodelingin oluşmasına olanak tanınması,

6- İdame döneminde gingivitis ve diğer inflamatuar granülasyon dokularının oluşmasına ve tekrarlamasına engel olunması gerekmektedir.

Bu şartlar sağlandığında protetik rehabilitasyonu sağlanan implantların 5 yılı aşkın bir süre boyunca herhangi bir intraosseöz ankraj kaybına uğramadan kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Osseointegrasyonun sağlanması sırasında, kemik-implant ara yüzünde meydana gelen olaylarda ekstraselüler matriks proteinlerinin, plateletlerin salgıladığı çeşitli büyüme faktörlerinin ve vazoaktif aminlerin kontrolü altında; kemik formasyonunda yer alan hücrelerin diferansiyasyonunun, migrasyonunun ve adezyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu işlem oldukça kompleks bir mekanizmaya sahiptir (Chug ve ark 2013). Kemik vücuttaki destekleyici ve metabolik görevlerini yerine getirebilmek amacıyla, mekanik, metabolik, biyoelektrik değişikliklere ve salgılanan lokal medyatörlere karşı tepki vermektedir. Kemiğe dental implantın yerleştirilmesini takiben, çoğunlukla lokal sitokin ve büyüme faktörleri tarafından yönetilen bir osteojenik cevap meydana gelmektedir. Bölgesel vaskülarizasyona bağlı bir biçimde meydana gelen bu cevap, kemik-implant ara yüzünde oluşan mikro hareketler neticesinde başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle kemik-implant ara yüzü ve fraktür gibi kemik bütünlüğünün bozulduğu durumlarda, iyileşme döneminde kemiğin ya da implantın fonksiyonel yük altında olmaması sıklıkla tercih edilmektedir (Misch 1999).

Remodeling ise daha önceden oluşmuş kemik dokusunun yeniden yapılandırılması olarak tarif edilebilir. Bu olayda, kemik oluşumundan sorumlu prekürsör hücrelerin aktivasyonu sonrasında, sırasıyla aktif rezorpsiyon, remisyon ve kemik oluşumu görülmektedir. Bu mekanizmanın işleyişi, remodeling döngüsü denilen bir süreci oluşturmaktadır (Misch 1999).

Kemikte meydana gelen modeling ya da “biçimlenme” kortikal ve trabeküler kemiğin şekil ve/veya boyutunda değişiklik oluşturan bir süreçtir. Meydana gelen hücresel aktivasyonu takiben, kemikte apozisyon veya rezorbsiyon meydana gelmektedir. Bu süreç, kemikte süregelen büyüme, atrofi ve adaptasyonun temel mekanizmasını oluşturmaktadır (Misch 1999).

Frosta göre kemikte meydana gelen yapım (modeling) ve yıkım olayları (remodeling) birbirini hayat boyu takip etmekte ve doğal kemik yapısının korunmasında önem arz etmektedir (Frost 1969). Benzer şekilde kemiğe osseointegre olmuş bir endoosseöz implantın, uzun vadede kemiğe tutunabilmesi ve rijit bir halde kalabilmesi için de kemikteki yapım ve yıkım mekanizmasının birbirini takip edecek biçimde devamlı olması gerektiği belirtilmektedir (Garetto ve ark 1995).

Dental implantların kortikal kemiğe yerleştirilmesi sonrasında defekt bölgesinde hızlı bir iyileşme görülür. Kırık iyileşmesinde olduğu gibi, kemiğe ait periosteal ve endosteal yüzeylerde kallus köprüleri oluşmaya başlar. Travmanın minimal olduğu ve vaskülarizasyonun yeterli olduğu durumlarda, yerleştirilen implantın etrafındaki birkaç milimetrelik alanda kallus formasyonu meydana gelmektedir (Misch 1999). Bu birkaç milimetrelik implant çevresi dokuda meydana gelen yeni kemik oluşumunun, canlı kemikten implanta doğru olmasının yanında; implant yüzeyinden başlayarak canlı kemiğe doğru ilerleyen kemik formasyonunun da meydana gelebildiği rapor edilmektedir. Şaşırtıcı biçimde, implant yüzeyinden kemiğe doğru meydana gelen kemik formasyonunun, kemikten implanta doğru meydana gelen kemik formasyonundan %30 oranında daha hızlı olduğu belirtilmektedir (Puleo ve Nanci 1999).

Tavşanlarda primer kallus, implant yüzeyinde 2 haftada oluşmaktadır, yeterli sertliğe ve uygun implant yükleme direncine ise 6 haftada ulaşılmaktadır. İnsanlarda bu konuya ilişkin bir çalışma olmamasına rağmen, elde edilmiş remodeling döngüsüne ait verilerden yola çıkarak, insanlarda remodelinge ait maturasyon fazının 3 kat daha uzun sürdüğü (yaklaşık 18 hafta) sonucuna varılmaktadır (Çizelge 1.1.) (Misch 1999).

Çizelge 1.1. Kortikal kemiğe yerleştirilen kemik içi implantların ara yüzünde gerçekleşen olayların kronolojisi (Misch 1999).

	Tavşan	**İnsan**
Yüzey oluşumu		
Aşama 1: Kallus oluşumu	2 hafta	6 hafta
Aşama 2: Lamellar yoğunlaşma	6 hafta	18 hafta
Remodeling ve maturasyon		
Aşama 3: Ara yüz remodelingi	6 hafta	18 hafta
Aşama 4: Yoğun maturasyon	18 hafta	54 hafta

1.1.2. Fibroosseöz Retansiyon Teorisi

Bu teorinin destekçisi olan Weiss, kemik-implant ara yüzündeki kollagen ipliklerin osteojenik etkiye sahip bir peri implant membranı oluşturduğu görüşünü savunmaktadır (Weiss 1986, 1987). Tarif edilen kollagen iplikler, implantın bir tarafındaki kemik trabeküllerinden köken alan ve implantların etrafını sararak diğer taraftaki kemik trabeküllerine bağlanan yapılar olarak nitelendirilmektedir. İmplantın fonksiyonel olarak yüklenmesini takiben, implantı çevreleyen ipliklerde sıkışma (kompresyon) görülmektedir. Bu durum ise implant çevresindeki kemik trabeküllerine yakın olan ipliklerde gerilim (tension) cevabının oluşmasına sebep olmaktadır. Bağ dokusunda meydana gelen bu mekanizmanın oluşturduğu biyoelektrik akım vasıtasıyla, kollagen iplikler, yapısal farklılaşma göstererek yeni kemik oluşumunu indüklemektedir (Misch 1999).

Brunski ve arkadaşlarının (1979) Blade-vent implantlar üzerinde yaptığı bir çalışmada ise endoosseöz olarak yerleştirdikten sonra, iyileşme döneminde çiğneme kuvvetlerine ve apikal kuvvetlere maruz kalan implantların etrafında fibröz enkapsülasyon oluşurken; herhangi bir kuvvete maruz kalmayan implantların etrafında kemik apozisyonu meydana geldiği anlaşılmıştır (Brunski ve ark 1979). Bu yönüyle incelendiğinde iyileşme döneminde implantlar üzerinde apikal yönde etkili olan çiğneme kuvvetlerinin, fibröz enkapsülasyon oluşumunda belirleyici rol üstlendiğine dair kuvvetli bulgulara ulaşılmıştır. Ancak implant çevresindeki fibröz enkapsülasyon, tek başına bir başarısızlık kriteri olarak kabul görmemektedir.

Meffert ve ark (1992)' na göre kemikte meydana gelebilen intraoperatif sıcaklık artışı haricinde, kemik-implant ara yüzünde bağ dokusu kapsülü oluşumuna yol açan sebepler aşağıda belirtilmiştir.

1-İmplantların postoperatif dönemde 3 ila 6 aydan önce protetik olarak yüklenmesi,

2- Bağ dokusu hücrelerini takiben, epiteliyal hücrelerin implant ara yüzünde apikale doğru migrasyonu,

3-İmplantın kemik içine çok yüksek tork ile yerleştirilmesi,

4-İmplantın kemiğe tam olarak uygun şekilde yerleştirilememesi.

İmplantın mobil olduğu durumlarda, fibröz enkapsülasyonunda genişleme görülür ve bu duruma istinaden mobilite daha da artar. İmplantın mobil olmadığı durumlarda ise ara yüzdeki bağ dokusu genişliği minimaldir ve implant fonksiyon görmeye devam eder. Bu duruma özellikle mesh dizaynlı implantlarda daha sık rastlanmaktadır (Meffert ve ark 1992).

Carlsson ve ark (1988) tavşan tibiasına 3,7 mm, 3,0 mm ve 2,0 mm' lik implantları, 3,7 mm çapındaki kavitelere bikortikal olarak yerleştirmişlerdir. Yerleştirilen her bir implant her iki tarafından kemiğe başka bikortikal vida ve plak ile sabitlenerek iyileşme süresince meydana gelebilecek gevşeme ve mobilitenin önüne geçilmiştir. Mesafenin olmadığı, 0,35 mm ve 0,85 mm' lik kemik-implant arası mesafelerin bulunduğu 3 farklı gruptan; aralık olmayan grupta ideal kemik-implant

arası bağlantı görülmekte; bununla beraber kemik-implant kontağında yumuşak dokuya rastlanmamaktadır. Mesafenin 0,35 mm olduğu grupta ise ortalama 0,22 mm' lik boşluk olduğu anlaşılmıştır. Bazı implantlar etrafında küçük trabeküler kemik bağlantıları oluşsa da, implantı çevreleyen kortikal kemiğe rastlanmamıştır. 0,85 mm boşluk bırakılan grupta ise 6. hafta sonunda kemik-implant arasında direkt kemik bağlantısı görülmemiştir. Bu yönüyle incelendiğinde implantın kemiğe tam olarak uygun şekilde yerleştirilmesi osseointegrasyon açısından önem arz etmektedir.

1.1.3. Biyointegrasyon

Dental implantlar üzerinde yapılan son çalışmalar, "osseointegrasyon" tabirine ek olarak "biyointegrasyon" terimini gündeme getirmiştir. dePutter ve ark (1985)' nın yaptığı bir çalışmada implant ankrajında iki farklı mekanizma olduğu gözlemlenmiştir. Bunlar "mekanik retansiyon" ve "biyoaktif retansiyon" olarak adlandırılmıştır.

Mekanik retansiyon, titanyum ve titanyum alaşımların üzerindeki delikler, boşluklar, oyuklar ve vida yivleri yoluyla titanyum yüzeydeki dioksit tabakası ile kemik arasında gerçekleşen bağlantı biçimidir. Kimyasal bağlantı bu retansiyon biçiminde önemli değildir.

Biyoaktif retansiyon ise, hidroksiapatit gibi çeşitli biyomateryallerin doğal dişlerde görülen ankiloza benzer bir mekanizma ile direkt olarak kemiğe bağlanması olarak tanımlanmaktadır (Misch 1999). Bu retansiyon şeklinde implant yüzeyinde yer alan biyoaktif alanlarla kollagen iplikler arasında meydana gelen fizikokimyasal etkileşimle hidroksiapatit tabakası üzerinde kemik matriksi yığılımı gözlenmektedir (Denissen ve ark 1986, Misch 1999). Biyoaktif materyallerin yeni kemik oluşumu üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalarda, biyointegrasyona bağlı olarak implant stabilizasyonunun daha erken dönemlerde arttığı gösterilmiştir (Cook ve ark 1987, Tan ve ark 2012). Ayrıca elektron mikroskobuyla görüntülenebilen ve çeşitli mekanik tutunma mekanizmalarından bağımsız olarak, belirgin bir şekilde kemik ve implant arasında oluşan biyokimyasal bağlantı "biyointegrasyon" olarak tanımlanmıştır (Block ve ark 1987).

1.2. Biyomateryaller ve Fizikokimyasal Özellikleri

Biyomateryaller bir vücut fonksiyonunun düzeltilmesinde ya da bir organın yenilenmesinde ve tedavisinde kullanılan sentetik, doğal ya da modifiye edilmiş materyallerdir. Bu materyaller biyolojik sistemlerle uyum içerisinde etkileşim gösterirler (Williams 1999) Eski çağlardan beri çeşitli amaçlarla biyomateryaller kullanılmaktadır. Kıl, pamuk, hayvanlara ait tendonlar, ağaç kabukları ve derinin doğal sutur materyali olarak kullanımı 4000 yıl öncesine dayanmaktadır. Metal-seramik polimerler ve bunların karışımlarını içeren materyaller ise "biyomedikal materyaller" olarak isimlendirilmektedir. Sahip oldukları güç, elastikiyet ve dayanıklılığın yanında biyomateryaller, toksik reaksiyon oluşturmayan özellikte, steril edilebilir ve biyolojik olarak uyumlu olmalıdırlar. Materyalin vücutla temasında immün sistemi aktive etmemesi veya kanda pıhtılaşmaya sebep olmaması, malzemenin biyoinert ve biyouyumlu olduğunu göstermektedir (Brady ve ark 1996). İnsan vücudundaki özellik ve fonksiyonlarına göre biyomedikal materyaller genel olarak; metaller, polimerler ve seramikler olarak 3 ayrı başlık altında incelenmektedir.

Metal biyomateryal grubunda yer alan titanyum alaşımları biyolojik ortamlardaki yüksek korozyon direnci ve dayanıklılığı sebebiyle diğer metallere nazaran, dental implantlarda, kalça ve diz kapağı eklemi protezlerinde daha sık bir şekilde tercih edilmektedir. Buna ek olarak zirkonyumla kaplanan titanyum alaşımlarının da ortopedi ve diş hekimliği alanında kullanılabileceği gösterilmiştir (Lee ve ark 2014a).

Polimer biyomateryallerden olan polimetilmetakrilat gibi polimerler ise ortopedik cerrahide kalça ve eklem protezlerinde ve diş hekimliğinde kullanılmaktadırlar (Venkat ve ark 2013, Guilleminet ve Judet 2014) .

Seramik grubu biyomateryallerden olan alüminyum oksit (Al_2O_3) ve zirkonyum (ZrO_2) gibi seramikler de sahip oldukları yüksek dayanıklılık ve abrazyona karşı yüksek dirençleri sebebiyle dişlere yerleştirilen kron, köprü protezleriyle ve kalça eklemi protezlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Zhu ve ark 2013, Kang ve ark 2014, Tanaka ve ark 2015). Bu seramiklerden farklı olarak medikal alanda kalsiyum fosfat içeren seramikler de kullanılmaktadır (Dorozhkin ve Epple 2002). Kullanılan bu seramikler, kemik dokusunda yer alan mineral içeriğine benzer düzeyde kalsiyum ve

fosfat iyonları içerdiklerinden, vücuttaki iskelet sistemini ilgilendiren rekonstrüksiyonlarda kullanılabilmektedirler (Hench 1991). Hidroksiapatit seramikleri, biyoaktif camlar, biyoaktif cam seramikleri, biyoaktif kompozit materyaller (Bonfield ve ark 1981) ve biyoaktif kaplamalar (Abe ve ark 1990) bu içeriğe sahip malzemelere örnek gösterilebilir (Hench 1991).

Kalsiyum fosfat seramiklerinin sahip oldukları biyoaktivite, osteokondüktivite ve kemik morfojenik proteinlerinin (BMP) tutunmasına olanak sağlayan yüzey özellikleri sebebiyle, sert dokuların rejenerasyonunda kullanılabilecek potansiyele sahip bir biyomateryal grubu olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla üretilen kalsiyum fosfat seramikleri kemik defektlerinin tamirinde ve augmentasyonunda kullanılmaktadır. Üretilen bu kemik greftleri kökenlerine, kompozisyonlarına, fiziksel formlarına ve fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılabilirler (LeGeros 2002).

Günümüzde biyolojik olarak üretilen kalsiyum fosfat seramiklerine mono kalsiyum fosfat monohidrat (MCPM), mono kalsiyum fosfat anhidrat (MCPA), dikalsiyum fosfat dihidrat (DCPD veya braşit), dikalsiyum fosfat anhidrat (DCPA veya monetit), oktakalsiyum fosfat (OCP), α-trikalsiyum fosfat (α-TCP), β-trikalsiyum fosfat (β-TCP), amorf kalsiyum fosfat (ACP), kalsiyum-yetersiz hidroksiapatit (CDHA), hidroksiapatit (HA), floroapatit (FA) ve tetrakalsiyum fosfat (TTCP) örnek olarak gösterilebilir. İsmi geçen materyaller Ca/P molar oranlarına ve vücut dokularındaki çözünebilirliklerine göre farklı biyolojik özellikler ihtiva etmektedirler (Dorozhkin ve Epple 2002).

Kalsiyum fosfat seramiklerinden salınan iyonların doku sıvısında birikmesiyle, seramik yüzeylerde kemiğin apatit kristallerini içeren yüzeyler oluşmaktadır. Bu durum sert doku ile seramik yüzey arasında biyolojik bir bağlantı meydana geldiğini göstermektedir. Seramik yüzeylerin ihtiva ettiği kristal yapının kompozisyonundaki oransal farklılıkların, seramik yapının canlı ortamdaki çözünme düzeyini, yani biyoçözünürlüğünü kontrol etmede etkili olduğu savunulmaktadır (Daculsi ve ark 1989, Lu ve ark 2002).

1.3. Kalsiyum Fosfat Seramiklerinin Yapı ve Özellikleri

Kalsiyum fosfat seramikleri, farklı kimyasal kompozisyonlara, kristallografik özelliklere ve suda çözünme düzeylerine sahiptirler. Kalsiyum fosfat seramikleri kimyasal içeriklerine, kristal yapılarına ve biyoçözünürlüklerine göre sınıflandırılmaktadır (Dorozhkin ve Epple 2002). Bu bileşikler sahip oldukları farklı kızılötesi spektrum (IR) ve X-Işını kırınım (XRD) piklerine göre birbirlerinden ayrılabilmektedir (Layrolle ve Daculsi 2009). Bu kristallerin sahip olduğu kimyasal özellikler, çözünürlük düzeyi (Çizelge 1.2), kızılötesi spektrum değerleri (Çizelge 1.3) ve X-Işını kırınım pikleri (Çizelge 1.4) ilgili çizelgelerde açıklanmaktadır.

Çizelge 1.2. Kalsiyum fosfatların Ca/P molar oranı, çözünürlüğü ve pH değeri ile solüsyonların stabil sıcaklık aralıkları.

Kalsiyum Fosfat Kristalleri	**Ca/P oranı**	**Çözünürlük –log(Kç)[1]**	**pH değeri ve stabil sıcaklık aralığı (^{0}C)**
MCPM	0,5	1,14	0,1-0,2 25^{0}C
MCPA	0,5	1,14	0,1-0,2 >80^{0}C
Braşit	1,00	6,59	2,0-5,5 25^{0}C
Monetit	1,00	6,90	2,0-5,5 >80^{0}C
OCP	1,33	96,6	5,5-7,0 25-37^{0}C
CDHA	1,33-1,66	~85,1	6,5-9,5 25-37^{0}C
ACP	1,2-2,2	25,7-32,7	5-12 4-37^{0}C
β-TCP	1,50	25,5	[2]
α-TCP	1,50	25,5	[2]
HA	1,67	116,8	9,5-12,0 >80^{0}C
FA	1,67	116,8	7-12 >80^{0}C
TTCP	2,0	38-44	[2]

[1] Kristallerin 25^0 C' de su içerisindeki çözünürlüklerinin, mol/L birimindeki logaritmik iyon konsantrasyonları belirtilmiştir.

[2] Bu kristaller, sadece çok yüksek sıcaklıklarda oluşturulabilmektedir (β-TCP > 800 ^{0}C, α-TCP > 1125 ^{0}C, TTCP > 1300 ^{0}C).

Çizelge 1.3. Bazı kalsiyum fosfat kristallerinin kızılötesi titreşim bantları.

CaP Kristalleri	**Kimyasal Formülü**	**Kızılötesi Pikleri ν (cm^{-1})**	**İlgili Grup**
Braşit	$CaHPO_4.2H_2O$	3542 3490 1132 1060 984 525	H_2O (kristal suyu) HPO_4^{-2}
OCP	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$	1105 1070 1031 954 603 530	HPO_4^{-2}, $PO4^{-3}$
β-TCP	β-$Ca_3(PO_4)_2$	1120 1043 970 943 606 551	PO_4^{-3}
HA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	3562 1081 1030 954 631 601 570	OH^- PO_4^{-3} OH^- PO_4^{-3}

Çizelge 1.4. Bazı kalsiyum fosfat kristallerinin X ışını kırınım pikleri (λ=1,54060Å).

CaP Kristalleri	**Kimyasal Formülü**	**XRD pikleri 2θ (^{0})**	**Yoğunluk (%)**
Braşit	$CaHPO_4.2H_2O$	11,681 20,935 29,258 30,506 34,156 34,426	100 100 75 50 50 30
OCP	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$	4,722 9,441 25,872 26,002 31,555 31,704	100 15 17 20 33 32
β-TCP	β-$Ca_3(PO_4)_2$	17,005 25,803 27,769 31,027 34,372 52,946	20 25 55 100 65 25
HA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	25,879 31,774 32,197 32,902 34,049 46,713 49,469	40 100 60 60 25 30 40

1.3.1. Mono Kalsiyum Fosfat Monohidrat (MCPM) ve Mono Kalsiyum Fosfat Anhidröz (MCPA)

Mono kalsiyum fosfat monohidrat (MCPM); kimyasal formülü $Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$ olan ve gerçek kimyasal ismi " mono kalsiyum dihidrojen fosfat monohidrat " olan bir kalsiyum fosfat seramiğidir. Monokalsiyum fosfat anhidröz (MCPA) ise kimyasal formülü $Ca(H_2PO_4)_2$ olan ve kimyasal olarak " kalsiyum dihidrojen fosfat anhidröz " olarak isimlendirilen bir kalsiyum fosfat seramiğidir. MCPM 100^0C' nin üzerindeki sıcaklıklarda sahip olduğu su molekülünü kimyasal olarak kaybederek MCPA' ya dönüşür (Dorozhkin 2009).

Literatürde yapılan sınıflandırma içerisinde pH değeri, Ca/P oranı en düşük ve sudaki çözünürlüğü en yüksek olan kalsiyum fosfat seramiğidir (Dorozhkin 2009). MCPM tıbbi alanda üretilen farklı kalsiyum fosfat ürünlerinin mekanik direncinin arttırılmasında kullanılmaktadır (Mirtchi ve ark 1989a, Carey ve ark 2005). Ayrıca MCPM, tarım alanında toprağın verimini arttırmak amacıyla fosfat verici kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Lehr ve ark 1959). MCPA ise tıbbi amaçla kullanılmamaktadır.

1.3.2. Dikalsiyum Fosfat Dihidrat (DCPD veya Braşit)

DCPD literatürde braşit minerali olarak bilinmekte ve kimyasal olarak $CaHPO_4.2H_2O$ olarak formüle edilmektedir (Hench ve Best 2013). Mirtchi ve ark (1989a) kalsiyum fosfat monohidrat (MCPM) ile β-trikalsiyum fosfat (β-TCP) tozlarını suda karıştırarak yeni bir materyal elde etmiştir. Reaksiyonun devamında meydana gelen egzotermik reaksiyon sonucunda ise sert bir materyal olan braşit elde edilmiştir. Ancak elde edilen bu materyalin klinik çalışma süresinin yetersizliği ve mekanik dayanıklılığının azlığı sebebiyle araştırmacılar çeşitli kimyasal katkı maddeleri kullanarak bu dezavantajları ortadan kaldırmayı klinik olarak başarmışlardır (Mirtchi ve ark 1989 b). Bu yöntemden farklı olarak kalsiyum hidroksit süspansiyonu ve ortofosforik asit solüsyonunun ekimolar miktarlarda 25^0C' deki oda sıcaklığında karıştırılmasıyla kimyasal reaksiyonun son aşamasında da braşit elde edilebilmektedir (Ferreira ve ark 2003).

DCPD biyolojik ortamlarda patolojik kalsifikasyonlardan biri olan intervertebral disk kalsifikasyonlarında (Chou 1982), diş taşlarının yapısında (Nancollas ve Johnsson 1994) ve üriner sistemdeki kalsifikasyonlarda (LeGeros ve ark 1983) görülebilmektedir. Buna ek olarak sağlık alanında DCPD, diş macunlarının yapısında (Gaffar ve ark 1993) ve ilaç taşıyıcı sistemlerde (Hofmann ve ark 2009) kullanılmaktadır. Bu amaçla DCPD simanlarına yerleştirilmiş doksisiklinin periodontal hastalık etkeni olan patojenler üzerinde (A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, ve B. Frosthytus) antibakteriyel etkisi olduğu gösterilmiştir (Tamimi ve ark 2008a).

DCPD kristalleri osteokondüktif özelliğe sahiptir. Bu sebeple kemik defektlerinin augmentasyonlarında etkin şekilde kullanılabilecek bir greft materyali olarak nitelendirilebilirler (Habibovic ve ark 2008).

Oral ve maksillofasiyal cerrahi alanında ise in vivo ortamda oluşturulan kalvarial tavşan kemik defektlerinin doldurulması amacıyla β-trikalsiyum fosfat (β-TCP) ve monokalsiyum fosfat (MCP) karışımının, glikolik asit içerisinde eritildiği bir greft materyali elde edilmiştir. Bu greft materyalinin kimyasal reaksiyon sonucunda büyük bir oranda DCPD ve daha az miktarda β-TCP kristallerine dönüştüğü görülmüştür. Elde edilen materyal, defektlerde 4. haftanın sonunda yeni kemik oluşumuna olumlu yönde katkı sağlamıştır (Marino ve ark 2007).

Ayrıca kemik grefti olarak kullanımının dışında, çeşitli biyouyumlu yüzeylere DCPD kaplamanın in vivo ortamda yeni kemik oluşumuna olumlu katkı sağladığı gösterilmiştir (Biemond ve ark 2011). Osteokondüktif etkili DCPD kristalleri ve osteoindüktif özellikteki GDF-5 proteiniyle kaplanan titanyum implantların 6. hafta sonunda, kontrol grubuna göre kemiğe daha iyi bir şekilde tutunduğu gösterilmiştir (Simank ve ark 2006). DCPD kristalleri in vivo ortamda rezorbe olabilen biyouyumlu bir materyaldir. Bu kristal yapıların implant yüzeylerine kaplanması, immün reaksiyona neden olmamaktadır (Reigstad ve ark 2007).

1.3.3. Dikalsiyum Fosfat Anhidrat (DCPA veya Monetit)

DCPA ise monetit olarak bilinmekte ve $CaHPO_4$ olarak formülize edilmektedir. Monetit mineralinin Ca/P oranı 1:1 olarak bilinmektedir (Hench ve Best

2013). β-trikalsiyum fosfat (β-TCP) ile kalsiyum fosfat monohidrat (MCPM) karışımının reaksiyonu esnasında ortamda MCPM'nin fazla miktarda bulunmasına bağlı olarak meydana gelen endotermik kristalizasyon reaksiyonu sonucunda monetit kristalleri oluşmaktadır (Bohner ve Gbureck 2008). Yukarıda anlatılan biçimde gliserol içerisinde krem kıvamında hazırlanan ve aynı kristalleri içeren (β-TCP ve MCPM) kimyasal karışımın, serum fizyolojik içeren ortamda bırakılmasıyla da monetit elde edilebilmektedir (Aberg ve ark 2010). Bu yöntemlerin haricinde braşit kristallerinin termal konversiyonu yoluyla da monetit elde edilebilmektedir (Tamimi ve ark 2008b).

Monetit kristallerinin osteokondüktif özelliğe sahip olduğu, yapılan in vivo çalışmada gösterilmiştir (Tamimi ve ark 2009). Monetit içerikli kemik greftleri, oral ve maksilofasiyal cerrahide kemik defektlerinin tamirinde kullanılabilir görünmektedir (Habibovic ve ark 2008). Monetit içeren onlay kemik greftlerinin, in vivo tavşan modelinde oluşturulan kemik defektlerinin vertikal augmentasyonlarında başarıyla uygulanabildiği gösterilmiştir (Torres ve ark 2011). Başka bir in vivo çalışmada ise aynı teknikle sentetik olarak üretilen monetit onlay greftlerle otojen onlay greftler karşılaştırılmış, her iki greft arasında yeni kemik oluşumu ve vertikal kemik kazancı bakımından benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Tamimi ve ark 2009).

1.3.4. Oktakalsiyum Fosfat (OCP)

Oktakalsiyum fosfat; $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$ olarak formülize edilen ve Ca/P oranı 1,33 olan bir kalsiyum fosfat kristalidir (Hench ve Best 2013).

Saf OCP kristalleri; sodyum asit fosfat solüsyonu ile kalsiyum asetat solüsyonu karışımının, pH' nın 5 ile 6 arasında tutulduğu 60^0C sıcaklıktaki bir ortamda 3 ila 4 saat sürede meydana gelen bir kimyasal reaksiyonun sonucunda elde edilebilmektedir (LeGeros 1985). Diekwisch ve ark (1995) yaptıkları çalışmada, erken dönemdeki mine kristallerinin yapısında OCP kristallerinin bulunduğunu göstermişlerdir. Ayrıca in vivo ortamda, kemik yüzeyine temas eden, ancak periostla arasında membran bulunan OCP kristallerinin, yeni kemik oluşumuna olanak sağladığı rapor edilmektedir. Bu durum OCP kristallerinin, osteoblastları veya osteoprogenitör hücreleri indükleyerek yeni kemik oluşumuna yardımcı olabildiklerini göstermektedir (Sasano ve ark 1999).

Buna ek olarak Crane ve ark (2006) OCP kristallerinin, intramembranöz kemik oluşumunda ve prematür sutur kapanışı esnasında artış gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Yeni kemik oluşumu üzerindeki olumlu etkileri (Imaizumi ve ark 2006) ve osteokondüktif özellikleri (Suzuki ve ark 1991) sebebiyle OCP kristallerinin kemik grefti olarak kullanımı gündeme gelmiştir. OCP' nin biyoçözünürlüğünün, hidroksiapatite göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Yeni kemik oluşum hızına paralel şekildeki greft rezorbsiyon hızının pratik anlamda önemli olduğu düşünüldüğünde, OCP içeren greftler, hidroksiapatit içeren greftlere göre daha uygun bir seçim olarak kabul edilebilir (Imaizumi ve ark 2006).

1.3.5. β-Trikalsiyum Fosfat (β-TCP)

β-Trikalsiyum fosfat; kimyasal olarak β- $Ca_3(PO_4)_2$ olarak formülize edilen ve Ca/P oranı 1,5 olan diğer bir sentetik kalsiyum fosfat seramiğidir (Hench ve Best 2013). β-TCP kristalleri, kalsiyum yetersiz hidroksiapatitin (CDHA) 700^0C' de termal dekompozisyonu ile hazırlanabilmektedir. Bu reaksiyon aşağıda özetlenmiştir (Liou ve Chen 2002).

$$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH) \longrightarrow 3Ca_3(PO_4)_2 + H_2O$$

Bu reaksiyona ek olarak, çeşitli asidik kalsiyum fosfat kristallerinin, kalsiyum oksit (CaO) gibi bir materyalle katı hal reaksiyonuyla da β-TCP kristallerinin oluşturulabildiği gösterilmiştir (Yokogawa ve ark 1991). Bu çalışmada, zirkonyum yüzeyi 1000^0C sıcaklıkta 40 dakika süreyle kalsiyum metafosfatla (CaO_6P_2) kaplanmıştır. Daha sonra bu tabakanın üzerine kalsiyum metafosfat ve tetrakalsiyum fosfat ($Ca_4(PO_4)_2O$) karışımının 1200^0C' deki 40 dakikalık reaksiyonu sonucunda 100 μm kalınlığında β-TCP kristali kaplanabildiği rapor edilmektedir.

Saf haldeki β-TCP kristalleri biyolojik kalsifikasyonlarda bulunmamakla birlikte, bu kristalin Mg içeren formu olan magnezyum whitlockite kristali aort kapakçıklarında (Gawoski ve ark 1985), intervertebral disklerde (Taylor ve Little 1963), embriyonik kemiklerde (Lee ve ark 1986) görüldüğü bildirilmektedir. Ayrıca whitlockite, dentin çürüklerinde (Daculsi ve ark 1987) ve diş taşlarının yapısında da (Kodaka ve Miake 1991) (Kodaka ve ark 1989) bulunabilmektedir.

β-TCP kristalleri içeren kemik greftleri oral ve maksillofasiyal cerrahide, alveolar rezorpsiyona bağlı olarak oluşan defektlerin rekonstrüksiyonunda kullanılmış ve başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (Palti ve Hoch 2002). Sahip olduğu biyoçözünürlük ve osteokondüktif özellikler yönüyle β-TCP içeren kemik greftleri, alveol kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda uygun bir materyal olarak görülmektedir.

TCP kristallerinin kaplama materyali olarak kullanıldığı bazı deneysel çalışmalar bulunmaktadır (Roy ve ark 2008, Gao ve ark 2014). Literatürde bu kristallerin biyouyumlu olduğu ve ekstraselüler matriks oluşumuna katkı sağladığı belirtilmektedir. β-TCP kaplanan Ti implant yüzeylerinin, hidroksiapatit kaplanan yüzeylere göre belirgin düzeyde daha iyi kollajen tutunması sağlayabildiği ve daha belirgin bir osteoblastik cevap oluşturabildiği belirtilmektedir (Hosaka ve ark 2006).

1.3.6. α-Trikalsiyum Fosfat (α-TCP)

α-TCP; kimyasal olarak α-$Ca_3(PO_4)_2$ olarak formülize edilen ve Ca/P oranı 1.5 olan sentetik bir kalsiyum fosfat seramiğidir (Hench ve Best 2013). CDHA (Ca/P: 1.56) kristallerinin aşağıda verilen formüle göre hidrotermal metotla 800^0C' nin üzerindeki sıcaklıkta β-TCP elde edilmekle beraber; deney ortamı 1200^0C ve üzerindeki sıcaklıklara ulaştığı durumda aşağıdaki formülde de gösterildiği şekilde, α-TCP kristalleri elde edilebilmektedir (Jokic B ve ark 2007).

$$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)_5 \longrightarrow 3\alpha\text{-}Ca_3(PO_4)_2 + H_2O \quad T \geq 1200^0C$$

α-TCP kristalleri biyolojik kalsifikasyonlarda bulunmamaktadır. Ancak tıbbi alanda kalsiyum fosfat simanların elde edilmesinde, saf α-TCP kristallerinden yararlanılmaktadır. Bu amaçla elde edilen materyaller, çalışma sürelerine ve sahip oldukları basınç mukavemetlerine göre, diş hekimliği veya ortopedi alanında kullanıma uygun görünmektedir (Bermúdez ve ark 1994).

β-TCP' nin α-TCP'den daha stabil olduğu kabul edilmektedir (Yin ve ark 2003). Bu sebeple α-TCP'nin biyomedikal alandaki kullanımı fazla ilgi görmemekle birlikte, sahip olduğu rezorptif özelliklerini daha uyumlu hale getirebilmek ve biyolojik performansını arttırabilmek amacıyla silikon içerikli α-TCP kristali içeren

kompozit malzemeler kullanıma sunulmuştur (Sayer ve ark 2003, Reid ve ark 2006). Elde edilen bu ürünün daha stabil bir hale geldiği ve kemik grefti olarak kullanılabileceği literatürde gösterilmiştir (Yin ve Stott 2005).

1.3.7. Amorf Kalsiyum Fosfat (ACP)

ACP, kimyasal olarak $Ca_xH_y(PO_4)_z.\ nH_2O$ olarak formülize edilmektedir (n=3-4,5 , %15-20 H_2O). Kalsiyum ve ortofosfat iyonları içeren solüsyonların hızlı bir şekilde karıştırılmasıyla, amorf kalsiyum fosfat kristalleri elde edilebilmektedir (Dorozhkin 2009). Bu amaçla % 10' luk sodyum polifosfat $(NaPO_3)_n$ ve kalsiyum klorür ($CaCl_2$) solüsyonları kullanılabilmektedir (Sinyaev ve ark 2001).

Günümüzde tıbbi alanda ACP içerikli materyaller, diş hekimliğinde dolgu materyali olarak (Choudhary ve ark 2012), ortodontik apareylerin dişlere yapıştırılmasında (Hammad ve ark 2013), cerrahi olarak kemik rekonstrüksiyonlarında kemik grefti olarak (Driessens ve ark 1998) kullanılmaktadır.

1.3.8. Kalsiyum-Yetersiz Hidroksiapatit (CDHA)

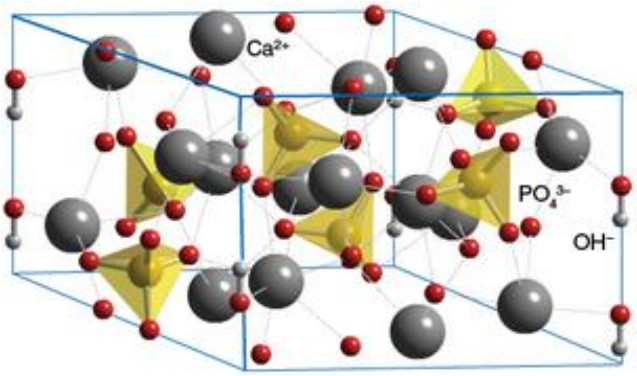
CDHA kalsiyum eksikliği olan bir çeşit hidroksiapatittir ve kimyasal olarak $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ $0<x<1$ şeklinde formülize edilmektedir (Dorozhkin 2009). Bu kalsiyum fosfat kristali, 30 ila 75^0C arasındaki sıcaklıktaki deiyonize su içerisinde, α-TCP kristallerinin 1:1 oranındaki (v/w) hidrolizi ile elde edilebilmektedir. Bu reaksiyonun 75^0C' deki deney ortamında gerçekleştirilmesiyle, daha düzenli CDHA kristallerinin elde edildiği rapor edilmektedir (TenHuisen ve Brown 1998).

Zhou ve ark (2007) yaptıkları bir çalışmada, elde edilen CDHA kristallerinin, HPO_4^{-2} içeren apatit yapılar olduğunu göstermişlerdir. Bu yapı içerisindeki HPO_4^{-2} ortadan kalktığında Ca/P oranı da 1,67' ye ulaşmakta ve meydana gelen kristal yapı hidroksiapatit olarak isimlendirilmektedir.

Günümüzde CDHA kontrollü ilaç salınım sistemlerinde (Liu ve ark 2005, Kamitakahara ve ark 2013), sahip olduğu biyouyum ve osteokondüktif özellikler nedeniyle de doku mühendisliğinde (Guo ve ark 2009) kullanılmaktadır.

1.3.9. Hidroksiapatit (HA)

HA kimyasal olarak $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ olarak bilinmesine rağmen, sahip olduğu iki moleküllü kristal üniteye atıfta bulunmak amacıyla literatürde sıklıkla $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olarak formülize edilmektedir. HA, floroapatitten sonraki en stabil ve en az çözünen kalsiyum fosfat kristali olarak bilinmektedir (Şekil 1.1) (Dorozhkin 2009).



Şekil 1.1. Hidroksiapatit kristalinin 3 boyutlu şematik gösterimi (Chemtube3d 2015).

Saf haldeki HA kristallerinin Ca/P oranı 1,67 olarak bilinmektedir. Ancak 1,67' nin üzerindeki oranlara sahip kristaller "Kalsiyumdan zengin apatitler" olarak isimlendirilmektedir. Ca^{+2} iyonları ve eşdeğer miktarda negatif iyon absorbe eden apatitler bu sınıfa dahil edilebilirler (Elliot 1994).

HA kristallerinin biyomedikal alanda kullanılabileceği çok önceki yıllarda gösterilmiştir (Levitt ve ark 1969). Bunun üzerine araştırmacılar çeşitli HA üretim yöntemleri geliştirmişlerdir. Yaş kimyasal metotla (Monmaturapoj 2008), sol-jel metoduyla (Padmanabhan ve ark 2009), hidrotermal metotla (Wang ve ark 2006), sürekli çökeltme (Mobasherpour ve ark 2007) ve katı hal reaksiyonları (Pramanik ve ark 2005) ile sentetik HA kristalleri sentezlenebilmektedir.

Ayrıca sentetik yolların dışında, doğal kaynaklardan köken alan sığır kemiği kaynaklı (Joschek ve ark 2000), balık kemiği kaynaklı (Goto ve Sasaki 2014) ve mercan kaynaklı HA (Sivakumar ve ark 1996) kristalleri de elde edilebilmektedir.

Bununla birlikte, tavuk yumurtasının kabuğundan da nanokristal yapıdaki HA elde edilebildiği gösterilmiştir (Siva Rama Krishna ve ark 2007). Nanokristal (Granülleri 100 nanometreden daha küçük) yapıdaki HA' ların biyolojik olarak uyumlu oldukları ve konvansiyonel HA kristallerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha hızlı rezorbe olabildikleri, daha önce yapılan bir çalışmada belirtilmektedir (Webster ve ark 2001).

Günümüzde HA, sahip olduğu biyoaktif özelliği nedeniyle kalça eklemi protezlerinde (Herrera ve ark 2013) ve dental implantların yüzeylerinde (Golec ve Krauser 1992) kaplama materyali olarak kullanılmaktadır. Ayrıca dental implant cerrahisi öncesinde, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda da (Brunel ve ark 2001) yararlanılan materyallerden olan HA' lar ilaç taşıyıcı sistemlerde de kullanılmaktadır. Bu sistem sayesinde antibiyotiklerin kontrollü salınımları sağlanabilmektedir (Brohede ve ark 2009).

1.3.10. Floroapatit (FA)

Floroapatit kristalleri kimyasal olarak $Ca_5(PO_4)_3F$ formülize edilmelerine rağmen, genellikle iki moleküle sahip kristal ünitesine atıfta bulunmak amacıyla $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$ olarak ifade edilmektedirler (Dorozhkin 2009). Ayrıca kristal yapılarında hidroksil iyonu (OH^-) yerine yer alan F^- iyonu sebebiyle en stabil apatit yapı olarak kabul edilmektedir (Mathew ve Takagi 2001). Literatür incelendiğinde FA' lar, sol-jel tekniği (Montazeri ve ark 2011), katı hal reaksiyonları (Wei ve ark 2003) ve hidrotermal reaksiyonlarla (Escudero ve ark 2013) sentezlenebilmektedir.

FA kristalleri, insanın diş yapısındaki apatit kristallerinden daha serttirler ve daha iyi termal stabiliteye sahiptirler (Chen ve Miao 2005, Menéndez-Proupin ve ark 2011) . Sahip oldukları üstün nitelikleri nedeniyle FA, diş hekimliğinde diş minesi defektlerinin tamirinde (Wei ve ark 2011) ve yeni kemik oluşumuna yardımcı olması nedeniyle implant yüzeylerinde (Dhert ve ark 1994) kullanım alanı bulmaktadır.

1.3.11. Tetrakalsiyum Fosfat (TTCP)

TTCP, Ca/P oranı en yüksek kalsiyum fosfat seramiği olarak kabul edilmekte ve kimyasal olarak $Ca_4(PO_4)_2O$ olarak formülize edilmektedir (Dorozhkin 2009). Bu

seramiğin sudaki çözünürlüğü diğer kalsiyum fosfat seramikleri ile kıyaslandığında, daha yüksektir. Ancak kimyasal formülünde oksijen atomu içermesinden ötürü sıvı ortamlarda sentezlenmesi mümkün değildir (Jalota ve ark 2005). Bu sebeple TTCP seramikleri katı hal reaksiyonları ile sentezlenmektedir. Bu işlem, Ca/P oranı 2 olan, kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) ve monetit ($CaHPO_4$) karışımının 1450^0C' deki 6 saatlik katı hal reaksiyonu ile gerçekleştirilebilmektedir (Matsuya ve ark 1999). Reaksiyon aşağıda gösterilmektedir:

$$2CaHPO_4 + 2CaCO_3 \longrightarrow Ca_4(PO_4)_2O + 2CO_2 + H_2O$$

Bu reaksiyonun dışında plazma sprey tekniği ile elde edilen hidroksiapatit kaplama materyalinin kompozisyonunda da 800^0C ve üzerindeki reaksiyon sıcaklıklarında TTCP ve α-TCP istenmeyen bir şekilde yer almaktadır. Meydana gelen bu istenmeyen reaksiyonun, Ti tarafından katalizlendiği düşünülmektedir (Weng ve ark 1994).

TTCP içeren ve deneysel olarak hazırlanmış olan yüzeyde, meydana gelen yeni kemik oluşumu, osteoblastların yüzeye göçü ve yeni oluşan ekstraselüler matriks, ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde gösterilmiştir (Yoshimine ve ark 1996). Ayrıca TTCP' nin, β-Kalsiyum pirofosfat ($Ca_2P_2O_7$), β-TCP ve HA ile in vivo ortamda kıyaslandığı bir çalışmada; (Kitsugi ve ark 1995) bütün seramik yapıların, kemiğe yerleştirilme sonrasındaki dönemde küçülerek benzer şekilde rezorbe olduğu gösterilmiştir.

Sahip olduğu olumlu niteliklerinden ötürü, TTCP seramikleri diş hekimliğinde, kök kanalı dolgu materyali (Laghios ve ark 2000) ve pulpa kaplama ajanı (Yoshimine ve Maeda 1995) olarak kullanılmaktadır.

1.4. Kalsiyum Fosfat Seramiklerinin Çözünme Özellikleri

Kalsiyum fosfat seramiklerinin çözünürlükleri, seramiğin kimyasal kompozisyonu ve kristal özellikleriyle yakından ilişkilidir. Çözünürlük düzeyi, kalsiyum fosfatların sıvılarda çözünmesini, çeşitli yöntemlerle çöktürülmesini, hidrolizini ve faz dönüşümlerini etkilemesi yönüyle önem arz etmektedir. Bu

değişiklikler kristal yapının biyolojik ortamlardaki davranışını da yakından etkilemektedir (Chow 2001, Layrolle ve Daculsi 2009).

Yapılan bir çalışmada Ca/P oranı 1,0 olan kalsiyum fosfat seramiklerinin (DCPA, DCPD), Ca/P oranı 1,33-1,67 arasında olan kalsiyum fosfat seramiklerine (OCP, ACP, TCP, HA) göre H_3PO_4 içeren ortamda çok daha hızlı bir biçimde çözündüğü gösterilmiştir (Sun ve ark 2010). Ancak Ca/P oranı 1,33-1,67 arasında olan kristal yapılar arasında çözünme düzeyleri yönüyle benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Ayrıca aynı çalışmada Ca/P oranı artışıyla beraber, kristalin bazik karakterinin artış gösterdiği rapor edilmektedir. Benzer başka bir çalışmada (Klein ve ark 1990) ise in vitro ortamda TTCP, TCP ve HA'nın pH değerleri 6,2 veya 7,2 olan farklı tampon solüsyonlarına maruz bırakıldığında çözünme oranları TTCP ≥ TCP > HA olarak sıralanmıştır. Aynı çalışmada, kalsiyum fosfat seramiklerin tipine ek olarak, kullanılan tampon solüsyonunun da çözünme üzerinde etkisi olduğu öne sürülmektedir (Klein ve ark 1990). Daha önce yapılan yukarıda bildirilen çalışmaların sonuçlarına paralel olarak, başka bir çalışmada stoikometrik HA' dan, CDHA, oksiHA, β-TCP, α-TCP ve TTCP' ye doğru gidildikçe kalsiyum fosfat seramiklerinin çözünme oranlarının arttığı gözlenmiştir (Ducheyne ve ark 1993).

Bu özellikten yola çıkarak araştırmacılar, farklı kalsiyum fosfat kristallerini uygun oranlarda karıştırarak üretilen greft materyallerinin in vivo ortamdaki rezorpsiyon hızlarının kontrol altında alınabileceğini göstermişlerdir (Daculsi ve ark 1989).

1.5. Kalsiyum Fosfat Seramikleriyle Kaplama Teknikleri

Günümüzde tıbbi alanda kullanılmakta olan implantların klinik başarısı, kemikle implant arasındaki sıkı bağlantı oluşumu ve ilgili ara yüzde fibröz doku tabakası bulunmamasına bağlı olarak belirlenmektedir (Meffert ve ark 1992). Hasta ve cerrahi faktörlere ek olarak, kullanılan implant materyaliyle kemik arasında meydana gelen biyolojik reaksiyonlar, implantın sahip olduğu mekanik özelliklere, yüzey kimyası ve pürüzlülüğüne göre şekillenmektedir (Jansen ve Leâon 2009).

Kalsiyum fosfat seramikleri ve titanyum alaşımları, kaybedilen kemiğin yerine kullanılabilecek materyaller içerisinde en uygun olanlarıdır. Ti ve alaşımları sahip

oldukları mekanik direnç ve yüzeylerinde oluşan titanyum oksit tabakası (Parsegian 1983) vesilesiyle dokular tarafından daha iyi kabul edilebilir gözükmektedir. Oluşan bu ince tabaka, koruyucu bir bariyer görevi görmekle beraber, biyolojik ortamlarda metal yüzeyinin korozyona uğramasına da engel teşkil etmektedir. Ayrıca oluşan Ti oksit tabakası, kemiğin biyolojik cevabını da olumlu yönde etkilemektedir. Kalsiyum fosfat seramikleri ise biyolojik yanıtın hızlandırılması, kemik-implant arasındaki tutunmanın güçlendirilmesi amacıyla kullanılmakta ve kemiğin gelişiminde yapı iskelesi vazifesi görmektedirler (Jansen ve Leâon 2009).

Hücreler ve ekstraselüler matriks hariç tutulduğunda, kemik ve dişlerdeki temel bileşen HA' dır. Ancak kalsiyum fosfat seramiklerinin sahip olduğu zayıf ve kırılgan yapı, büyük streslere maruz kalan vücut bölgelerinde kullanılmaları konusunda engel teşkil etmektedir. Bu sıkıntının üstesinden gelebilmek amacıyla, Ti implant yüzeylerinin kalsiyum fosfat seramikleriyle kaplanması fikri gündeme gelmiştir. Bu fikirden yola çıkılarak titanyumun sahip olduğu mekanik direnç ile kalsiyum fosfat seramiklerinin üstün biyolojik özellikleri çeşitli kaplama yöntemleri kullanılarak birleştirilebilmekte ve insanlık yararına sunulabilmektedir (Jansen ve Leâon 2009).

1.5.1. Plazma Sprey Tekniği

Bu teknikte plazma tabancasındaki katot ve anot arasında yüksek voltajlı elektrik akımı elde edilmektedir. Yüksek enerjili elektrotların arasına yönlendirilen inert gaz ise, elektrik akımı vasıtasıyla iyonize hale gelerek plazmayı oluşturmaktadır. Plazma içerisinde yer alan iyon ve elektronlar ise birbirinden ayrılmakta ve elektrotlara doğru hızlandırılmaktadır. Çok hızlı hareket eden bu partiküllerin, gaz içerisindeki diğer atom veya moleküllerle çarpışması sonucunda ortam sıcaklığında artış ve takiben inert gazda genleşme meydana gelmektedir. Bu mekanizma sonucunda plazma tabancası ucunda, çok yüksek hızlara ulaşabilen plazma alevi oluşmaktadır. Sisteme kalsiyum fosfat partiküllerinin eklenmesiyle beraber, partiküller plazma tabancasıyla, kaplanacak yüzeye doğru püskürtülmektedir (Jansen ve Leâon 2009). Bu işlem esnasında elde edilen plazma sıcaklığı 10000 ile 15000^0C derece arasında olmaktadır (Gill ve Tucker 1986).

Kullanılan kalsiyum fosfat seramiğinin kimyasal yapısı, partikül büyüklüğü ve plazma alevinin sıcaklığı plazma sprey tekniği ile yapılan kaplamaların biyolojik özellikleri üzerinde etkili olmaktadır (Wolke ve ark 1992).

Plazma sprey tekniği ile elde edilen kalsiyum fosfat kaplamalarının adezyonunun iyi oluşu, kalın kaplama yüzeyleri oluşturulabilmesi ve işlemin hızlı bir şekilde yapılabilmesi nedeniyle bu uygulama, klinik kullanım açısından geniş yer bulmaktadır (Narayanan ve ark 2008).

Ancak bu teknikle elde edilen kaplama yüzeyleri kalınlık, kristalinite, biyoçözünürlük, adezyon direnci, yorulma dayanımı ve yabancı cisim reaksiyonu açısından çeşitli dezavantajlara sahiptir. Elde edilen kalınlık yönüyle incelendiğinde bu teknikle 50 ile 200 μm arasında kaplama kalınlığı elde edilmekte ve artan kalınlıkla beraber, kaplama yüzeyindeki rezidüel streslerde artış görülmektedir. Bu durum kaplama yüzeyinden ayrılmalara neden olabilmektedir (Jansen ve Leâon 2009). Yapılan bir çalışmada 50 μm kalınlıktaki hidroksiapatit kaplamanın, 200 μm kalınlıktaki kaplamaya göre daha yüksek kayma dayanımına sahip olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark 1993).

Kristallinite düzeyi kalsiyum fosfat seramiklerinin biyolojik davranışları ve çözünmeleri üzerinde etkili olmaktadır. Plazma sprey tekniği ile elde edilen kaplama yüzeyindeki amorf yapıdaki HA kristallerinin, biyolojik ortamlardaki çözünmelerinin daha hızlı olduğu gösterilmiştir (Wolke ve ark 1992).

Kristal yapı, mikroporozite, kristalinite, kimyasal kompozisyon, Ca/P oranı, yüzey defektleri, partikül boyutu ve kaplamada kullanılacak olan granüllerin saflığı, gibi faktörler plazma sprey tekniği ile elde edilen kaplamaların biyoçözünürlüğü üzerinde etkili olmaktadır (de Groot ve ark 1987, Radin ve Ducheyne 1992, Wolke ve ark 1992, Jansen ve Leâon 2009).

Plazma sprey tekniği ile elde edilen hidroksiapatit kaplama kompozisyonunda, istenmeden oluşan ve reaksiyonlarının Ti yüzey tarafından katalizlendiği düşünülen TTCP ve α-TCP kristalleri bulunmaktadır (Weng ve ark 1994). Bu istenmeyen kalsiyum fosfat kristallerinin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla elde edilen kaplama materyali 0,15 MPa basınç altında, 125^0C sıcaklık altında 6 saat boyunca su buharına

maruz bırakılarak, TTCP, α-TCP kristallerinin de kristal yapıdaki HA' ya dönüşmesi sağlanabilmektedir. Ancak bu ek işlem sonrasında HA kaplama yüzeyi ve Ti alaşım yüzeyi arasındaki adezyon direncinde bir miktar azalma olduğu belirtilmektedir (Cao ve ark 1996). Adezyon direnci, plazma sprey tekniği ile elde edilen kaplama yüzeylerinin kalınlığı ile yakından ilişkili gözükmektedir. HA ile yapılan 50 μm kalınlıktaki kaplamanın, 240 μm kalınlıktakine göre daha yüksek adezyon direncine sahip olduğunu rapor edilmiştir (Filiaggi ve ark 1991, Jansen ve Leâon 2009). Benzer şekilde, diğer bir çalışmada plazma sprey tekniği ile ilgili kaplamaların yorulma dayanımı incelenmiştir (Lynn ve DuQuesnay 2002). Bu çalışmada, kullanılan farklı kaplama kalınlıkları arasında, 150 μm kalınlığındaki kaplamanın yorulma direncinin belirgin düzeyde daha düşük olduğu anlaşılmıştır; bu kalınlıktaki bir kaplama yüzeyi elde edebilmek amacıyla kullanılan plazma sprey kaplama işleminin oluşturduğu yüksek sıcaklık ve kaplama süresinin uzunluğunun, yorulma direncinin azalmasındaki en önemli faktör olduğu dile getirilmektedir. Ayrıca 25 ile 50 μm kalınlığındaki kaplamalarda yorulma direnci testleri sırasında delaminasyon görülmemiştir.

Plazma sprey tekniğiyle elde edilen kaplama yüzeylerinin sahip olduğu çeşitli dezavantajlar nedeniyle, daha ince kaplama yüzeyleri elde edilmesine olanak sağlayan başka kaplama teknikleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerin geliştirilmesindeki temel amaçlar; substrat yüzeyine daha iyi tutunmayı sağlamak, daha düşük rezidüel streslere sahip olan kaplama yüzeyleri elde etmek, hazırlanan kaplama materyalinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini daha iyi bir düzeyde kontrol edebilmektir (Jansen ve Leâon 2009).

1.5.2. Lazer Ablasyon Tekniği

Lazer demeti tekniği, "darbeli lazerle yığma sistemi" olarak da isimlendirilmektedir (Yurtcan ve ark 2011). Bu teknikte hedeflenen yüzeye gönderilen yüksek enerjili lazer demeti, yüzeydeki materyalleri vakumlu ya da gaz içeren bir ortamda kaynatıp buharlaştırmaktadır. Açığa çıkan bu materyallerin oluşturduğu plazma bulutu, yüksek enerjiye sahip atomlar, moleküller, iyonlar ve elektronlar içermektedir. Plazma bulutunun sahip olduğu içeriğin, işlemin gerçekleştirildiği ortamın da etkisiyle kaplanmak istenen ve "substrat" olarak adlandırılan materyalin yüzeyine çökmesi sağlanmaktadır. İşlem esnasında hedeflenen yüzey ile substrat

birbirine paralel şekilde belirli bir mesafede bulunmaktadır ve ortam sıcaklığı oda sıcaklığıyla 800^0C arasında olabilmektedir. Uygulanan lazerin etkisiyle istenen substrat yüzeylerinde ince film şeklinde kaplama yüzeyleri oluşturulabilmektedir (León 2009).

Plazma sprey tekniği ile kıyaslandığında, lazer ablasyon tekniği aşağıdaki avantajlara sahiptir (León 2009);

1-Elde edilen kaplama çok daha incedir. Kaplama kalınlığı lazerin uygulanma süresi değiştirilerek kontrol edilebilmektedir,

2-Kaplama materyalinin dağılımı homojendir ve bu dağılım çok iyi bir şekilde kontrol edilebilmektedir,

3-Kaplama materyaliyle kaplanacak substrat yüzeyi arasında yeterli düzeydeki adezyonunun sağlanması amacıyla, çeşitli yüzey aktivasyon tekniklerine ihtiyaç duyulmamaktadır,

4-Enerji kaynağı olarak lazer kullanılması, plazma sprey tekniğine göre işlemin çok daha temiz bir ortamda yapılmasına olanak sağlamaktadır,

5-Bu teknikle metallere ek olarak, çeşitli yüzey modifikasyonları uygulanarak polimer yüzeyler de kaplanabilmektedir,

6-In vivo ve in vitro değerlendirmelerde plazma sprey tekniğiyle aynı ya da daha iyi osseointegrasyon değerlerine ulaşılmaktadır. Ayrıca bu teknikle yapılan kaplama yüzeylerinde, çok düşük kalınlıklarda kaplama yüzeyleri elde edilebildiğinden, delaminasyon riski azalmakta ve bu durum plazma sprey tekniğine göre avantaj sağlamaktadır.

Bu teknik endüstriyel kullanım açısından daha uygun olmakla beraber, dental implantlar üzerinde de çeşitli araştırmacılar tarafından deneysel olarak kullanılmıştır (Blind ve ark 2005, Dinda ve ark 2009). Bu deneysel çalışmalarda yüksek kristalliniteye sahip saf HA kaplama yüzeyleri elde edilmiştir. Bu yönüyle incelendiğinde elde edilen kaplama yüzeylerinin; biyolojik ortamlarda kullanıma

uygun, vücut sıvılarında yavaş bir şekilde çözünen ve uygun implant yüzeyi adezyonuna sahip olduğu rapor edilmektedir.

Ayrıca yapılan in vivo bir çalışmada 24 hafta sonunda lazer ablasyon tekniği ile elde edilen 2 μm kalınlıktaki kaplama yüzeyinin, plazma sprey tekniği ile elde edilen 50 μm kalınlıktaki kaplama yüzeyine göre kemik gelişimine daha fazla katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Peraire ve ark 2006).

Lazer ablasyon tekniği çeşitli avantajlara sahip olmakla birlikte lazerlerin ve vakum ortamı oluşturacak ekipmanların pahalı olması sebebiyle endüstriyel alanda yaygın bir kullanım alanı bulamamıştır. Bu alanda kullanılan ekipmanların yaygınlaşması ve ucuzlaması, bu tekniğin endüstriyel olarak daha cazip hale gelmesine yardımcı olacaktır (León 2009).

1.5.3. İyon Demeti Tekniği

Endüstriyel olarak yarı iletken teknolojisinin gelişmesiyle elektron ve iyonlar gibi çeşitli yüklü partiküllerin soğuk plazma atmosferi içerisinde kullanımıyla, ince film tabakası üretim teknikleri geliştirilmiştir. Bu sistem çevreye atık oluşturmayan, yüksek kalitede, hasarsız bir şekilde kaplama tabakası oluşturulması yönüyle öne çıkmaktadır. Bu tekniğin plazma sprey tekniğinden en önemli farkı, sistemin yüksek vakum altında ya da soğuk plazma atmosferinde gerçekleştirilebilmesidir (Yoshinari 2009).

Bu tekniğin çeşitli varyasyonları iyon implantasyonu (Yoshinari ve ark 2001b), iyon püskürtme (Hanawa ve Ota 1992), iyon kaplama (Yoshinari ve ark 1991) ve iyon demeti dinamik karıştırma (Hayakawa ve ark 2002) olarak rapor edilmektedir.

İyon implantasyon işleminde, 1×10^{17} ile 1×10^{15} iyon/cm^2 yoğunluklar arasındaki Ca iyonlarının, 40 kiloelektron volt (keV) enerji altında hızlandırılmasını takiben titanyum yüzeylere çarptırılmasıyla yüzey kaplaması yapılabildiği rapor edilmiştir (Nayab ve ark 2005).

İyon püskürtme ve kaplama metotlarında ise HA, yüzeyine çarptırılan elektron demetleriyle buharlaştırılmaktadır. Buharlaşan kristaller, argon iyonları vasıtasıyla püskürtülmektedir. İşlem esnasında metal substrat yüzeylerine birkaç yüz ile birkaç

bin volt arasında değişen elektrik enerjisi uygulanmaktadır. Ortamdaki yüksek enerji ile oluşan maddenin plazma hali, buharlaşan materyallerin iyonizasyonunu sağlamakta ve oluşan iyonlar ortamdaki elektrik alanı vasıtasıyla hızlandırılarak, metal substrat yüzeylerinde biriktirilmektedir (Yoshinari 2009).

İyon demeti dinamik karıştırma tekniği ise iyon implantasyon tekniği ile iyon kaplama metotlarının birleşimidir. Bu teknik uygulanarak gerçekleştirilen HA kaplama yüzeyinin amorf yapıda HA kristalleri içerdiği ve işlem sonrası 600^0C sıcaklıkta yapılan 1 saatlik sinterleme işlemi sonrasında kaplamanın kristalinitesinde artış olduğu belirtilmektedir. Bu teknikle, diğer iyon demeti tekniklerine göre daha iyi tutunma dayanımı değerlerine sahip olan kaplama yüzeyleri oluşturulabilmektedir (Ohtsuka ve ark 1994).

İyon demeti teknikleri uygulanarak ince film tabakası şeklinde kalsiyum fosfat tabakası oluşturulabilmektedir. Kaplama kalınlığının düşük seviyelerde tutulmasıyla metal yüzeyiyle kaplama materyali arasındaki adezyonun çok yüksek seviyede olması sağlanabilmektedir. Ayrıca bu teknik, çeşitli biyolojik fonksiyonları olan iyonların (Yoshinari ve ark 2001a) ve ilaçların (Kajiwara ve ark 2005) da kaplama materyaline eklenerek yeni kompozit malzemelerin elde edilmesine de olanak sağlamaktadır.

Bifosfonatların kaplama materyaline eklenmesine olanak sağlayan iyon demeti tekniklerinin, implantların çevre kemiğe tutunmasına katkıda bulunan kaplama yüzeyleri oluşturabildiği rapor edilmektedir (Tengvall ve ark 2004, Kajiwara ve ark 2005).

İyon demeti tekniğiyle, tutunma dayanım değerleri ideal olan ince kaplama yüzeyleri elde edilebilmesine rağmen, kaplama yüzeyi oluşturma işlemleri yüksek maliyete sahiptir. Bu nedenle iyon demeti tekniği ticari olarak kendisine yer bulamamaktadır (Narayanan ve ark 2008).

1.5.4. Sıçratma Tekniği

Sıçratma tekniğinde kaplama işlemi oda sıcaklığındaki vakum ortamında gerçekleştirilmektedir. Bu teknik farklı atomların hedef materyal yüzeyinden, substrat yüzeyine atomik olarak sıçratılması esasına dayanmaktadır. Plazma veya iyon

tabancaları vasıtasıyla oluşturulan ve yüksek voltajla hızlandırılan iyonların, hızlı bir şekilde hedef materyal yüzeyine çarpmasıyla etrafa saçılan atom veya moleküller, substrat yüzeyine taşınmaktadır. Sonuç olarak substrat yüzeyinde mekanik olarak kilitlenebilen ve kimyasal olarak tutunabilen ince film şeklinde kaplama yüzeyleri elde edilebilmektedir (Ong ve ark 2009).

Sıçratma tekniği literatürde genel olarak radyofrekans (RF) magnetron sıçratma (van Dijk ve ark 1995), RF diyot sıçratma (Sobe ve ark 1993), doğru akım (DC) magnetron sıçratma (Song ve ark 1998), iyon demeti sıçratma (Rossnagel ve Cuomo 1988) ve reaktif doğru akım (DC) sıçratma (Drummond ve Scholl 1998) olarak alt sınıflara ayrılmaktadır.

Doğru akımla çalışan sıçratma tekniği, HA' ların yalıtkan materyaller olması sebebiyle, HA kristalleriyle yapılan kaplama işleminde uygulanamamaktadır (Ong ve ark 2009).

RF magnetron sıçratma tekniğindeyse, doğru akım sıçratma yöntemlerinin tam tersine alternatif akım kullanmaktadır. Ortamda serbest dolaşan elektronlar, hedef yüzey üzerinde oluşturulan manyetik alan sayesinde hedef materyalin yüzeyine yönlendirilebilmektedir. Uygulanan manyetik alan sayesinde, teknik daha verimli hale gelmektedir. Bu nedenle RF magnetron sıçratma tekniği, HA' nın da dahil olduğu birçok materyalle farklı yüzeylerin ince film şeklinde kaplanmasında en çok tercih edilen yöntemlerden biri haline gelmektedir (Ong ve ark 2009).

Ancak bu teknikte elde edilmesi planlanan kaplama materyalinin kalınlık ve kalitesi, hedef materyalin kompozisyonuna ek olarak, iyonize haldeki gaz basıncı (Meng ve Dos Santos 1993), kaplanacak yüzeyin sıcaklığı (Li ve ark 1993), tekniğin uygulandığı voltaja göre fiziksel ve kimyasal olarak farklılık göstermektedir (van Dijk ve ark 1995).

Sıçratma tekniğiyle elde edilen amorf HA kristalleri, depozisyon sonrasında farklı sıcaklık derecelerine tabii tutularak kristallinitesi daha yüksek hidroksiapatit kristal kaplama yüzeyi elde edilebilmektedir (Ong ve Lucas 1994) Ayrıca sıcaklığın uygulandığı ortam atmosferinde de değişiklik yapılarak kristalizasyon reaksiyonu hızlandırılabilmektedir (van Dijk ve ark 1996). Ancak kristalliniteyi arttırma amaçlı

olarak kaplama ve substrat yüzeylerinin çok yüksek sıcaklıklara maruz bırakılması sonucunda metalle kaplama materyalinin genleşme katsayıları arasındaki farklılıktan dolayı kaplama yüzeyinde mikro çatlakların oluşması ihtimalinin göz ardı edilmemesi gerekmektedir (van Dijk ve ark 1996).

Sonuç olarak, bu teknikle elde edilen kaplama yüzeyleri yüksek derecede uniform yapıda ve plazma sprey tekniğine göre daha ideal düzeyde metal yüzeyi tutulumuna sahiptir. Ancak bu teknikle elde edilen kaplama yüzeylerinin, kristalinitesini arttırmak amacıyla kaplama sonrası sinterleme işlemi gerekmektedir. Bu da uygun kaplama materyali eldesi için ikinci bir işlem basamağının gerekli olduğu anlamına gelmektedir. Sıçratma tekniğinin plazma sprey kaplama tekniğine alternatif olabilmesi için üzerinde daha fazla çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Ong ve ark 2009).

1.5.5. Elektrokimyasal Depozisyon Tekniği

Bu teknikle elde edilen kalsiyum fosfat kaplamaları, ancak ortamda iletken bir substrat ve kalsiyum fosfat içeren elektrolit sıvının olmasıyla elde edilebilmektedir. İşlem sırasında, kalsiyum fosfatın pH' ya bağımlı olarak çözünmesinden ve sıvı içerisindeki substrat yüzey pH' sının lokal olarak yükseltilmesinden faydalanılmaktadır. Substratın katodik polarizasyonuyla yüzey pH' sının arttırılması sonucu kalsiyum fosfat depozisyonu sağlanmaktadır (Scharnweber ve Bierbaum 2009). Bu işlem sırasında aşağıdaki reaksiyonlar meydana gelmektedir:

$$2H_2O + 2e^- \longrightarrow H_2 + 2OH^-$$

$$O_2 + 4e^- + 2H_2O \longrightarrow 4OH^-$$

Elde edilmesi planlanan kaplama yüzeyi kalınlığı; elektrolit içeriğinden, elektrolit pH' sından, reaksiyonun gerçekleştirildiği ortamın sıcaklık ve basıncından etkilenmektedir. Bu teknikle genel olarak elde edilen kaplama kalınlıklarının 10 μm'den daha ince olduğu belirtilmektedir (Scharnweber ve Bierbaum 2009).

Tekniğin avantajları;

1-Elde edilen kaplama yüzeyi incedir ve kompozisyonu varyasyon gösterir; kristal boyutu ve kimyasal özellikleri de kemiğe yakındır,

2-Kaplamanın kalınlığı ve kimyasal kompozisyonu, submikron düzeyinde kontrol edilebilmektedir,

3-Hem poröz yüzeylerde hem de düzensiz yüzeye sahip substratlarda, mükemmel homojeniteye sahip kaplamalar elde edilebilmektedir,

4-Yüksek spesifik yüzey alanı olan kaplamaların üretimi mümkündür,

5-Yapay beden sıvısında elde edilen kaplama üretim süresiyle kıyaslandığında, daha kısa sürede kaplama yapılabilmektedir,

6-Uygun pH, sıcaklık ve sıvı solüsyonu kullanılarak kalsiyum fosfat kaplamaya kombine olarak çeşitli proteinler ve peptitler de kaplanabilmektedir,

7-Sıcaklığın substrat materyali üzerinde olumsuz etkisi bulunmamaktadır,

8-Tekniğin uygulanışı yüksek enerji gerektirmemektedir,

9-Yapılan işlemin maliyeti düşüktür.

Tekniğin Dezavantajları;

1-Elde edilen kaplama materyalinin tutunma dayanımının düşük olması nedeniyle, üretilen kaplama yüzeylerinin aniyodik olarak oksit tabakası ile kombine edilmesi gerekmektedir,

2-Üst tabakası veya tamamıyla kendisi elektriği ileten bir substrat materyali gerekmektedir,

3-Yüksek akım yoğunluğu veya uzun süreli polarizasyon gerektiren çeşitli elektrokimyasal ortamlarda, metalik substratların hidrojen kırılganlığında artış meydana gelebilme riski bulunmaktadır.

Kaplama yapılacak olan substrat yüzeyinin polarizasyonu amacıyla sabit hücre voltajı, sabit potansiyel elektrolizi (potansiyostatik), sabit akım elektrolizi (galvanostatik) gibi teknikler kullanılmaktadır.

Galvanostatik yaklaşımda sabit akım kullanıldığından, işlem sonucunda oluşan OH^- iyonlarının miktarı da sabittir. Elektrostatik depozisyon tekniğinde galvanostatik işlemin kullanılması çalışmacılar açısından, meydana gelen reaksiyonlar üzerindeki kontrolü maksimuma çıkarmanın yanında, işlem esnasında sabit akım

kullanılmasından dolayı en güvenilir sonuçlara ulaşılmasına olanak sağlamaktadır (Scharnweber ve Bierbaum 2009).

Bu teknikle 10-20 mA/cm^2 akımla 50 ila 70^0C arasındaki sıcaklıkta, yaklaşık 20 μm kalınlıktaki uniform kalsiyum fosfat kaplama yüzeyinin elde edilebildiği rapor edilmektedir (Lopez-Heredia ve ark 2007).

1.5.6. Elektrosprey Kaplama Tekniği

Elektrosprey kaplama tekniği, organik solventler ve inorganik prekürsör materyallerinin yüksek voltaj altında aerosol oluşturmaları esasına dayanmaktadır. Oluşan aerosolun püskürtülmesiyle kaplama işlemi gerçekleştirilmektedir. Bütün püskürtme tekniklerinde, kaplanmak istenen materyali küçük damlacıklar haline dönüştürebilmek amacıyla hız kazandırmak gerekmektedir. Sistemdeki gaz atmosferi içerisinde gerçekleştirilen hızlandırma işlemi konvansiyonel püskürtme tekniklerinde, kinetik enerjiyle veya ultrasonik yöntemle gerçekleştirilirken; elektrosprey tekniğinde aynı işlem için elektrik yükleri kullanılmaktadır. Normalde püskürtülen materyal yuvarlak damlacıklar şeklindeyken, uygulanan yüksek voltaj nedeniyle konik forma dönüşmekte ve elektriksel olarak yüklü hale gelmektedir. Buna ek olarak sisteme yerleştirilen ısıtılmış substrat materyaliyle arasındaki potansiyel yük farkından dolayı aerosol, substrat yüzeyine yapışmakta ve ince film tabakası şeklindeki kaplama işlemi gerçekleşmektedir. Sonuç olarak, substrat yüzeyine tutunan yüklü materyaller nötr hale gelmektedir. Bu tekniğin plazma sprey tekniğine göre avantajları aşağıda sıralanmaktadır (Leeuwenburgh ve ark 2009);

1-Yöntem basittir ve maliyeti düşüktür,
2-Bu teknikte kullanılabilecek olası püskürtülebilen prekürsör solüsyonlar ve kaplanabilecek substratlar çok çeşitlidir,
3-Elde edilen kaplamaların kimyasal ve morfolojik özellikleri başarılı bir biçimde kontrol edilebilmektedir,
4-Kaplama kalınlığı plazma sprey tekniğine nazaran kolaylıkla kontrol edilebildiğinden, bu teknikle birkaç nanometre ile 30 μm arası kalınlıklarda kaplama yüzeyi elde edilebilmektedir,
5-Elektrik alanı ihtiva etmeyen konvansiyonel püskürtme teknikleriyle kıyaslandığında, kaplama işlemi daha yüksek verimde gerçekleşmektedir,

6-Plazma sprey tekniğinden farklı olarak bu yöntemde işlemler 400^0C sıcaklıkta gerçekleştirilebilmektedir,

7-Plazma sprey tekniğinde elde edilen kaplama materyallerinin tutunma direncini arttırmak amacıyla metal yüzeyine pürüzlendirme işlemleri uygulanması gerekmektedir. Elektrosprey tekniğinde bu tür bir işleme gerek duyulmamaktadır.

Elektrosprey tekniği ile elde edilen kaplama yüzeylerinin kimyasal özellikleri, işlemde kullanılacak solüsyonların konsantrasyonlarına, asidite durumlarına ve kullanılan tuzların tipine göre değişiklik göstermektedir (Leeuwenburgh ve ark 2004).Ayrıca sistemle ilişkili olarak substrat yüzeyine püskürtme mesafesi, kaplama materyali püskürtme oranı, kaplama sıcaklığı ve püskürtme geometrisi de kimyasal özellikleri belirlemede etkili olmaktadır (Leeuwenburgh ve ark 2009).

In vivo ve in vitro olarak uygun morfolojiye sahip kaplama materyallerinin üretilmesine imkan sağlayan, üretilen kaplama materyallerinin biyoçözünürlüğü ve elde edilen kristal yapıları üzerinde kontrolün sağlanabilmesine olanak sağlayan bu teknik, kalsiyum fosfat seramikleriyle yapılacak olan kaplama işleminde kullanılabilir gözükmektedir (Leeuwenburgh ve ark 2009).

1.5.7. Biyomimetik Kaplama Tekniği

Biyomimetik kelimesi literatürde "doğal sistemleri taklit eden" anlamına gelmektedir. Bilimin bir dalı olarak ise; araştırmacılar tarafından biyolojik sistemden ilham alan ve doku mühendisliğinde kullanılabilecek materyallerin geliştirilmesine öncülük eden bir branş olarak nitelendirilmektedir (Liu ve Hunziker 2009).

Kemik dokusu mühendisliği, hem biyolojik faktörlerden ve hem de materyal mühendisliğinin teknolojisiyle bilgi birikiminden faydalanan bir alandır. Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda, kemik dokusunda meydana gelen hasarları giderebilmek amacıyla, gen, hücre ve sitokin temelli çeşitli tedavi yöntemleri ortaya atılmıştır (Sokolsky-Papkov ve ark 2007).

Bu tedavi yöntemleri içerisinde sitokin temelli tedaviler, sahip oldukları uygulama kolaylığı, güvenli oluşları ve kliniğe yönelik uygulamalardaki potansiyelleri

göz önünde bulundurulduğunda; diğer yöntemlere göre öne çıkmaktadır (Saito ve Takaoka 2003). Uygun taşıyıcı materyalin sitokin dağıtımını, fizyolojik düzeyde ve sürdürülebilir bir biçimde sağlaması, kemik yapımındaki osteojenik etkinin devamlılığını sağlamak konusunda önem arz etmektedir (Saito ve Takaoka 2003, Cartmell 2009).

İdeal bir taşıyıcı materyal;

1-Biyouyumlu olmalı ve canlı dokuda toksik reaksiyon göstermemelidir,

2-Biyomekanik kuvvetler karşısında yeterli dayanıklılığa sahip olmalı, ancak bir süre sonra rezorbe olabilmeli ve ikinci bir elektif cerrahi ihtiyacını ortadan kaldırmalıdır,

3-Doğal bir ekstraselüler matriksi taklit edebilen özellikte olmalı, canlı dokudan gelen hücrelerin adezyonuna ve proliferasyonuna ortam oluşturabilmelidir,

4-Taşıyıcısı olduğu ilaç ya da sitokini homojen bir biçimde absorbe edebilmeli, kontrol edilebilir bir sürede ve dozda salınım yapabilmelidir,

5-Fizyolojik sıcaklıkta, ilaç ya da sitokin salınımına olanak sağlayan yapısal özelliklerini korumalıdır (Sokolsky-Papkov ve ark 2007).

Günümüzde, bu şartların bütününe sahip bir biyomateryal bulunmamaktadır. Bunlardan kalsiyum fosfat kaplama amacıyla birçok yöntem tanımlanmıştır. Ancak her birinin farklı limitasyonları bulunmaktadır. Kompleks yapıya sahip ya da poröz yüzeyli implantların kaplanması amacıyla yeni tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir (Zhao ve ark 2011). Yapılan çalışmalar neticesinde biyomimetik kaplama ile oluşturulan kalsiyum fosfat yüzeylerinin, bu konuda olumlu gelişmelere olanak sağlayabileceği düşünülmektedir (Murphy ve ark 2000, Liu ve ark 2010).

Ancak etkili bir biçimde biyomimetik kaplama yapılabilmesi için, metal yüzeyinin kaplama öncesinde aktivasyonu ve solüsyondaki kalsiyum fosfatın süpersatürasyonu gerekmektedir (Zhang ve Leng 2005a, Narayanan ve ark 2008).

Yüzey Aktivasyonunun Biyomimetik Kaplamaya Etkisi

Yüzey aktivasyonu sayesinde kaplama yapılacak metal yüzeyinde oksit tabakası oluşturulabilir, yüzey pürüzlülüğü veya kimyasal kompozisyonu modifiye edilebilir.

Fiziksel olarak yapılan yüzey aktivasyonunda, poröz bir alan oluşturmak için alüminyum parçacıklarıyla kumlama ve benzeri tekniklerden faydalanılabilir (Habibovic ve ark 2002, Ryan ve ark 2006).

Kimyasal olarak yapılan yüzey aktivasyonunda ise, asitle muamele, alkali ya da alkali-sıcak muamelesi, asit-alkali muamelesi, hidrojen peroksit muamelesi, anodik oksidasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Lausmaa 2001).

Asitle muamele işleminde standart olarak kabul gören solüsyon, % 10 ile 30' luk (HNO_3) karışımı ile nitrik asit ve % 1 ile 3'lük hidroflorik asitin (HF) distile su içerisinde 10:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilmektedir (Lausmaa 2001).

Alkali muamele işleminde ise, Ti yüzeyleri, 5-10 mol NaOH ya da KOH solüsyonunda, 60^0C sıcaklıkta 24 saat boyunca tutularak, mikroporöz yapıdaki alkalin titanat hidrojel tabakası oluşturulmaktadır. Ancak oluşan bu tabaka mekanik olarak stabil olmadığından dolayı, kimyasal işlem sonrasında, titanyum yüzeylerin 1 saat boyunca 600^0C sıcaklıkta bekletilmesi gerekmektedir. Bu sayede, dehidrate olan ve yoğunlaşan hidrojel tabakası, kristal yapıdaki alkali titanat tabakasına dönüşmektedir. Özellikle NaOH ile muamele edilen yüzeylerde, sıcaklıkla muamele işlemi biyoaktiviteyi bir miktar azaltırken, yüzeydeki hidrojel tabakasının mekanik dayanıklılığını arttırmaktadır (Kim ve ark 1996, 1997).

Vanzillotta ve ark (2006) yaptıkları çalışmada, saf Ti yüzeyleri 3 gruba ayırarak; asitle muamele, asitle muamele ve anodik oksidasyon işlemi, asitle muamele ve sıcaklıkla muamele yöntemi uygulanmıştır. Bir haftalık biyomimetik kaplama işlemi sonrasında yapılan incelemede, her üç yöntemden herhangi birine maruz bırakılan Ti yüzeylerin, işlem görmemiş titanyum yüzeylere göre daha gelişmiş bir biyoaktif yüzeye sahip olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca sodyum hidroksit (NaOH) veya potasyum hidroksitle (KOH) yapılan alkali işlem ve takiben sodyum titanat

yüzeyini sağlamlaştırmak amacıyla farklı sıcaklıklardaki ısıl işlemlerle amorf yapıdaki sodyum titanat yüzeyi elde edilebildiği belirtilmektedir. Biyomimetik kaplama işlemi öncesinde oluşturulan bu modifiye yüzey sayesinde, dolaylı yoldan da olsa, Ti yüzeydeki HA formasyonu hızında artış meydana geldiği rapor edilmektedir (Fatehii ve ark 2009, Kim ve ark 2013).

Asit-alkali muamelesi sırasında asit solüsyonuna giren Ti yüzey daha uniform pürüzlülüğe sahip olmaktadır. Sonrasında uygulanan alkali muamelesindeyse, Ti yüzeyinde mikroporözite oluşmaktadır. Meydana gelen mikroporöz yüzey, daha kalın bir titanyum oksit tabakasının oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. Bu yönüyle her iki solüsyon da, Ti implant yüzeylerinin biyoaktivitesini arttırmaktadır. Bu amaçla titanyum implantlar % 18'lik 100 mL HCI ve %48'lik 100 mL H_2SO_4 karışımında 30 dakika süreyle tutulmasına ek olarak, 140^0 C' deki NaOH solüsyonunda 5 saat süreyle muamele edilmektedir (Wen ve ark 1997, Wen ve ark 1998).

Hidrojen peroksit Ti yüzeyini pürüzlendirmesi yanında yüzeydeki oksit tabakasını da kalınlaştırmaktadır ve bu etkileşim titanyumun biyouyumu açısından yararlıdır (Tengvall ve ark 1989). Ti' nin, H_2O_2/HCI solüsyonuyla 80^0C' de bırakılması amorf yapıdaki TiO_2 tabakası oluşturmaktadır. Meydana gelen amorf yapıdaki jel tabakası, 300^0C üzerindeki sıcaklıkta, kristal yapıdaki TiO_2 yüzeyine dönüşmektedir (Wang ve ark 2002).

Biyomimetik Kaplama Tekniğinde Yapay Beden Sıvısı Kullanımı

Biyomimetik kaplama tekniği, genel olarak plazma tekniğine göre oldukça düşük sıcaklıklarda gerçekleşen ve önceden hazırlanmış süpersatüre kalsiyum fosfat solüsyonuna yerleştirilen substrat materyali üzerine, kemikte olduğu gibi HA ve OCP kristallerinin kaplandığı bir yöntemdir. Bu yöntem vasıtasıyla farklı Ti implantların osseointegrasyonu ve osseokondüktif özellikleri geliştirilebilmektedir (Habibovic ve ark 2005).

Teknik ilk defa Kokubo ve ark (1990) tarafından tanımlanmıştır ve in vitro ortamda $36,5^0$C sıcaklık ve 7,25 pH' daki yapay beden sıvısı (YBS) içerisinde, 7 ila 30 gün süreyle tutulan biyoglass seramik yüzeylerin hidroksiapatit kristalleriyle kaplandığı gözlemlenmiştir.

Araştırmacılar biyomimetik kaplama yöntemini hızlandırmak adına iyon konsantrasyonlarını değiştirerek yeni ve daha etkili biyomimetik solüsyonlar hazırlamışlardır. Habibovic ve ark (2005) yaptıkları çalışmada, kaplanacak materyaller için beş kez daha yoğun (YBS 5X) solüsyonu kullanmışlardır. Solüsyonun iyon konsantrasyonları, Kokubo ve ark (1990) tanımladığı konsantrasyonların 5 katı olarak belirlenmiştir. Bu işlemde solüsyonun pH' sını sabit tutmak amacıyla karbondioksit gazı kullanılmıştır ve işlem 37^0C' de, başlangıç pH'sı 5.8 olacak şekilde 24 saat sürmüştür (Çizelge 1.5).

Buna ek olarak biyomimetik kaplama işlemini hızlandırabilmek amacıyla YBS 1,5X (Varma ve ark 1999), YBS 5X (Jayasuriya ve ark 2008) ve YBS 10X (Tas ve Bhaduri 2004) solüsyonları farklı araştırıcılar tarafından kullanılmıştır.

Çizelge 1.5. İnsan kan plazması (İKP), yapay beden sıvısı (YBS 1X), beş defa konsantre edilmiş yapay beden sıvısının (YBS 5X) milimol (mM) cinsindeki iyon konsantrasyonları.

Sıvı	**Na^+**	**K^+**	**Mg^{+2}**	**Ca^{+2}**	**CI^-**	**HPO_4^{-2}**	**HCO_3^-**
İKP	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	1,0	27,0
YBS 1X	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	1,0	4,2
YBS 5X	726,0	25,0	7,5	12,5	760,0	5,0	21,0

Tas ve Bhaduri (2004) tarafından hazırlanan YBS 10X' de ise işlem basamakları azaltılmış, sistemin pH' sını kontrol etme amaçlı, önceki yapay beden sıvısı solüsyonlarında kullanılan tris ve HEPES gibi tampon solüsyonlarına veya CO_2' ye duyulan ihtiyaç ortadan kaldırılmıştır. Bu işlemlerin aksine, daha önceden hazırlanmış YBS 10X' e gerekli miktarda sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) eklenerek, araştırmacıların önerdiği uygun, pH 6,5' ta ve oda sıcaklığında 2 ila 6 saatlik süre sonunda Ti yüzeylere kalsiyum yetersiz hidroksiapatit kaplanabildiği rapor edilmektedir. Ancak dört veya altı saatlik kaplamalardan birinin yapılması planlandığında, her iki saatte bir kaplama solüsyonunun yenilenerek, tekrardan pH' sının düzenlenmesi gerekmektedir. Yapılan ölçümlerde elde edilen kaplama yüzeyi kalınlığının 20 ile 65 μm arasında değiştiği bildirilmektedir. Literatürde, çeşitli polimerlerin, kompozit yapıların ve titanyum alaşım yüzeylerinin bu teknikle,

kalsiyum fosfat kristalleriyle kaplandığı çalışmalar rapor edilmektedir (Nouri ve ark 2007, Yang ve ark 2008, Andric ve ark 2011, Kung ve ark 2014, Lin ve ark 2014).

Biyomimetik kaplama tekniğinin uygulanması kolaydır ve gerekli malzemelerin maliyeti açısından hesaplıdır. Bu teknikle iletken olmayan, kompleks geometriye sahip ve ısıya duyarlı materyaller de kaplanabilmektedir. İşlemin düşük sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilmesi, substrat ve kaplama materyali üzerindeki ısıdan kaynaklanan olumsuz etkileri ortadan kaldırmaktadır (Wen ve ark 1998). Bununla beraber, kaplamada kullanılacak solüsyonun iyon konsantrasyonları, pH ve sıcaklık değerlerinin kontrol edilebilmesi; biyolojik sistemlerdeki protein yapıların görevini yerine getirebilen, aktifleştirilmiş substrat yüzeyi elde edilebilmesi bu tekniğin en önemli iki karakteristik avantajı olarak göze çarpmaktadır (Bunker ve ark 1994).

Ayrıca biyomimetik kaplama metodu, inorganik materyallerle birlikte hali hazırda biyoaktif özellik taşıyan çeşitli proteinlerin de kaplanabilmesine olanak sağlamaktadır (Leonor ve ark 2005). Bu sayede osteokondüktif özellikteki materyal taşıyan yüzeye, osteoindüktif özellik gösteren materyaller eklenebilmektedir (Liu ve ark 2003a).

Proteinler, hücre içi ve dışında bulunan en önemli organik moleküllerdir. Proteinler, aminoasitlerin peptit bağlarıyla birbirine bağlanmasından oluşan polimerik yapılar olarak kabul edilmektedirler. Canlı organizmaların yapısal unsurlarının oluşumunda, hücre içi faaliyetlerin düzenlenmesinde, vücudun yabancı moleküllerden korunmasında ve çeşitli enzimatik reaksiyonların düzenlenmesinde görev almaktadırlar (Bailey ve Ollis 1986).

Proteinler diğer inorganik yapı ve makromoleküllerle etkileşime girerek, canlı vücudundaki biyolojik yapıları ve bu yapıların fonksiyonlarını kontrol edebilmektedirler (Sarikaya ve ark 2003). Proteinlerin biyomineralizasyon üzerinde de etkili olduğu in vitro bir çalışmada gösterilmiştir (Lakshminarayanan ve ark 2002). Ayrıca proteinler ekstraselüler matriks yapısının da organizasyonunda yer alarak, ortamdaki hücrelerin matriksle olan etkileşimleri üzerinde de etkilidirler. Osteoblastların, yerleştirilen implant materyaline adezyonu ve materyal üzerinde yayılımında fibronektin ve vitronektin gibi proteinlerin etkili olduğu rapor

edilmektedir (Steele ve ark 1993, Kilpadi ve ark 2001). Çeşitli makromoleküllerin, mineral sentezi ve ekstraselüler matriks organizasyonu üzerindeki etkilerinden yola çıkılarak, bu moleküllerin sert dokular üzerinde de etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla araştırmacılar doğal sistemleri taklit edebilen yapay sistemler (biyomimetik) geliştirerek, bu sistemlere entegre ettikleri çeşitli proteinler vasıtasıyla biyolojik işleyiş mekanizmalarını kontrol etmeye çalışmaktadırlar (Sarikaya 1999).

Bu bağlamda çeşitli proteinler, kaplama yapılan inorganik materyalin en üst yüzeyine yerleştirilmekten farklı olarak, kaplama materyali katmanları ile gerçek manada birleştirilebilmektedir. Böylece implantasyon alanında canlı kemik dokusu ile yakın ilişki halindeki kaplama materyalinde yer alan proteinlerin kademeli olarak salınımları sağlanabilmektedir. Çeşitli organik materyallerin kademeli olarak salınımlarının sağlanabilmesi, implant çevresindeki osteojenik etkilerin de uzun vadeye yayılmasına katkıda bulunmaktadır (Leonor ve ark 2005).

Ancak bu tarzdaki kaplamaların en belirgin dezavantajı, substrat materyaline zayıf bir şekilde bağlanmaları ve vücut sıvılarında kısa zamanda çözülebilmeleridir (Liu ve Hunziker 2009). Buna ek olarak materyalin yüksek sıcaklığa maruziyeti ve uygun olmayan pH ortamı nedeniyle proteinler çabucak denatüre olabilmektedir (Bailey ve Ollis 1986). Çeşitli metal implant yüzeylerinin biyomimetik olarak kalsiyum fosfat seramikleriyle kaplanması, bu materyallere osteokondüktif özellik kazandırmaktadır. Ancak elde edilen kaplama materyaline bu özelliğine ek olarak osteoindüktif özellik de kazandırmak amacıyla çeşitli büyüme faktörleri ve proteinler kaplama materyaline eklenebilmektedir. Bu amaçla günümüzde BMP gibi çeşitli organik maddeler de kullanılmaktadır (Kim ve ark 2012). Kemik morfojenik proteinler (BMPs), transforming growth factor beta (TGF-β) ailesine dahil proteinlerdir ve bir kısmı osteoindüktif özellik taşımaktadırlar (Wozney 1989, Massague 1990). Bu ailede yer alan BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6, BMP-7' nin osteoindüktif etkiye sahip olduğu çeşitli araştırıcılar tarafından gösterilmiştir (Wozney ve ark 1988, Gitelman ve ark 1995, Cheifetz ve ark 1996). Bu materyallerin biyomimetik yolla kalsiyum fosfat kaplamalarına eklenmesiyle elde edilen BMP-2 içerikli kalsiyum fosfat kaplı Ti yüzeylerin in vivo ortamda osteojenik aktivite gösterdiği rapor edilmektedir (Liu ve ark 2005).

Biyomimetik kaplamaya eklenen BMP üç farklı salınım mekanizmasına sahiptir;

1-Diffüzyon kontrollü hızlı salınım,

2-Kaplama yüzeyinin çözünmesiyle oluşan, kimyasal olarak kontrol edilen salınım,

3-Osteoklast aracılı salınım.

Diffüzyon Kontrollü Salınım

Kaplanan materyal yüzeyine yerleştirilen proteinlerin, in vitro salınım sistemi olarak kabul gören, 7,4 pH değerine sahip fosfat tamponlu serum fizyolojik solüsyonu içerisinde yaptığı salınımdır ve salınım düzeyi spektrofotometrik analizle takip edilebilmektedir. Poröz yüzeye sahip polimer esaslı taşıyıcıların sahip oldukları pürüzlü yüzeyler sayesinde, daha fazla miktarda protein bağlayan yüzey alanına sahip olmaktadırlar. Bu özellik, fibröz yüzeyli taşıyıcılara nazaran, erken dönemde bu taşıyıcıların daha hızı bir biçimde salınım yapabilmelerine olanak sağlamaktadır (Wu ve ark 2010). Meydana gelen salınım 3 ila 5 gün kadar sürmektedir ve salınım düzeyi; proteinin sahip olduğu çözünürlüğe, diffüzyon katsayısına, uygun taşıyıcı materyale, lokal konsantrasyona ve solüsyon içerisindeki proteinin yayılma miktarına bağlıdır (Li ve Wozney 2001).

Kimyasal Olarak Kontrol Edilen Salınım

Kimyasal olarak kontrol edilen salınım ise, kaplama materyalindeki çözünme yoluyla gerçekleşmektedir. Konuyla ilgili yapılan çalışmada (Wu ve ark 2010) 35 günlük takip süresinde meydana gelen salınım oranları, fibröz yüzeye sahip taşıyıcılardan Ethisorb® için % 31, PLGA için % 41 ve poröz yüzeyli taşıyıcılardan Helistat® için % 68 ve Polyactive® için % 74 olarak belirlenmiştir. Kullanılan polimer yapıların yüzey özellikleri, ilk etaptaki hızlı salınımı (ilk 5 günde meydana gelen salınım) etkilerken; sonrasında meydana gelen ve kimyasal olarak kontrol edilen salınım düzeyi üzerinde fazla etkili olmamaktadır.

Osteoklast Aracılı Salınım

Bu konuya ilişkin çalışmalar genel olarak incelendiğinde; yapılan çalışmaların in vitro ortamda gerçekleştirildiği göze çarpmaktadır. Ancak in vivo ortamda, in vitro ortamdan farklı olarak, kaplama yüzeyi multinükleer dev hücreler tarafından kuşatılarak inflamatuar bir cevap oluşturulabilmektedir. Oluşan yabancı cisim reaksiyonunu takiben; kaplama yüzeyi ile etkileşime giren osteoklastlar, yüzeyi rezorbe etmektedir (Liu ve ark 2005). Ortaya atılan teoriye göre; kaplama bölgesinde hali hazırda yer alan çeşitli büyüme faktörleri, osteoklastların kaplama bölgesinde oluşturduğu rezorpsiyonla serbest kalmaktadır. Ortamdaki düşük pH değeri, serbest kalan büyüme faktörlerinin aktivasyonunda etkili olmakta; salınan ve aktive olan büyüme faktörleri, osteoblastlarla etkileşime girerek, yeni kemik oluşumunu indüklemektedir. Bu mekanizma osteoklast aracılı salınıma örnek teşkil etmektedir (Howard ve ark 1981).

Sonuç itibariyla, yapılan çalışmalarda; kalsiyum fosfat yüzeylerine eklenen osteoindüktif materyallerin yüzeyel olarak eklenmiş olması, fizyolojik ortamda bu materyalden kontrolsüz ve hızlı bir biçimde salınım gerçekleşmesine sebebiyet vermektedir. Bu durum osteoindüktif etkinin erken dönemde çabucak sonlanması anlamına gelmektedir. Ancak kalsiyum fosfat yüzeyine homojen bir biçimde nüfuz edebilmiş osteoindüktif materyaller, daha yavaş ve kontrollü biçimde salınım gösterirler. Kullanılan bu organik materyalin yavaş salınım göstermesi, canlı dokular üzerindeki olumlu etkilerinin ve ortamdaki osteojenik aktivitenin daha uzun sürmesine olanak sağlamaktadır (Liu ve ark 2004, Liu ve ark 2005).

Benzer amaçlarla BMP dışında kollagen (Chen ve ark 2006), çeşitli antibiyotikler (Stigter ve ark 2004) ve serum albümini (Liu ve ark 2003b, Salama ve El-Sakhawy 2014) de kalsiyum fosfat kristalleri üzerine kaplanabilmektedir (Çizelge 1.6). Bu sayede kaplamayla birleştirilen farklı niteliklerdeki materyallerin in vivo ortamdaki olumlu özelliklerinden faydalanılabilmektedir.

Çizelge 1.6. Biyomimetik yöntemle, kalsiyum fosfat yüzeyine eklenerek kontrollü salınımı yapılabilen materyaller.

BMP	Ti alaşım üzerine biyomimetik olarak kalsiyum fosfat ve BMP 2 kaplanmış grup, BMP 2 emdirilmiş grubun da dahil olduğu kontrol gruplarına göre daha uzun süreyle rezervuar görevi görmüş ve daha yüksek osteojenik aktivite göstermiştir Liu ve ark 2005).
Kollagen	PLA yapı iskelesi üzerine YBS 5X ile kaplanan HA + kollagenin, sadece HA kaplanan gruba göre daha fazla osteoblast benzeri hücrenin yerleşimine olanak sağladığı gösterilmiştir (Chen ve ark 2006).
Serum Albumin	Ti alaşım üzerine biyomimetik yöntemle kalsiyum fosfat ve serum albumin kaplanmış ve biyomimetik kaplamanın in vitro ortamda serum albumin için taşıyıcı özellikte olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark 2003 Salama ve El-sakhawy 2014).
Çeşitli Antibiyotikler Vankomisin Gentamisin Tobramisin Amoksisilin Sefamandol Karbapenisilin Sefalotin	CDHA yüzey üzerine biyomimetik olarak çeşitli antibiyotikler kaplanmıştır. Kaplama materyalindeki antibiyotik konsantrasyonları, antibiyotiklerin kimyasal özelliklerine göre değişkenlik göstermektedir. Elde edilen kompozit materyalin in vitro ortamda S. Aureus bakterisi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Stigter ve ark 2004).

Diğer tekniklerle kıyaslandığında, biyomimetik kaplama aşağıdaki avantajlara sahiptir;

1-İşlemin farklı parametrelerini kontrol ederek, kaplanacak materyalin biyoaktivitesi, faz içeriği, kristallitesi ve çözünürlüğü ayarlanabilmektedir,

2-Yüksek sıcaklık gerektirmediğinden, kaplanacak materyal üzerinde sıcaklığa bağlı etkiler görülmez. Yüksek sıcaklıktan etkilenebilen materyaller de kaplanabilmektedir,

3-Pürüzlü ya da kompleks yüzeye sahip materyaller de bu sistemle kaplanabilmektedir,

4-Biyoaktif ajanlar ya da ilaçlar, sisteme entegre edilebilmektedir ve bu ilaç ya da ajanların da kontrollü salınımı yapılabilmektedir,

5-Teknik ucuz ve uygulaması kolaydır (Wen ve ark 1998, Zhao ve ark 2011).

1.6. Kalsiyum Fosfat Kaplamaların Karakterizasyon Teknikleri

Elde edilen kalsiyum fosfat seramik kaplamalar yanında diğer biyomateryallerin geliştirilebilmesi ve sahip oldukları eksikliklerin giderilebilmesi amacıyla, bu yapıların içeriklerinin, yapısal özelliklerinin ve mekanik dirençlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla her biri ferdi olarak avantaj ve dezavantajlara sahip, çeşitli inceleme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler in vivo ve in vitro çalışmalarda, biyopolimerlerin, sentetik polimerlerin incelenmesinde ve değerlendirilmesinde uygulanmaktadır (Feddes ve ark 2009, Nandi ve Biswas 2013).

Bu yöntemlere genel olarak aşağıdaki örnekler verilebilir:

1-Foton Temelli Yöntemler: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR), Raman spektroskopisi, X-Işını fotoelektron spektroskopisi ve X-Işını diffraksiyonu,

2-Mikroskobik Yöntemler: Tarama elektron mikroskopisi (SEM), Enerji dağıtıcı X-Işını spektroskopisi, Transmission (Geçirim) elektron mikroskopisi (TEM).

3-Histolojik Yöntemler,

4-Mikrotomografik Yöntemler,

1.6.1.Foton Temelli Yöntemler

Kızılötesi Spektroskopisi

Kızılötesi (IR) spektroskopi, moleküllerin sahip olduğu atomların elektromanyetik radyasyona maruz bırakıldıklarında meydana getirdikleri titreşimleri ölçümleyerek hızlı ve basit bir şekilde kimyasal analiz yapabilen bir yöntemdir. Bu yöntemin etkin bir biçimde uygulanabilmesi için, moleküllerin kızılötesi ışığı absorbe etmeleri ve bu absorbsiyon sonucunda moleküllerin dipol momentlerinde değişiklik meydana gelmesi gerekmektedir. Çünkü moleküllerin dipol momentlerindeki

değişimler, oluşturdukları titreşim ve rotasyonların ana nedenini oluşturmaktadır (Stuart 2000). Önceden belirlenmiş frekanslardaki, radyasyon emilim yoğunluğu, IR spektrumunda incelenebilmektedir. Kalıcı dipol momentine sahip olmayan moleküller kızılötesi radyasyona maruz kaldıklarında, ortamdaki elektrik alanın etkisiyle elektriksel alanları asimetrik hale gelmektedir. Bu durum "artmış dipol moment" olarak isimlendirilir ve molekül hakkında anlık da olsa bilgi verir (Feddes ve ark 2009).

Klasik kızılötesi spektrometrelerin kullanıma sunulmasından sonra Fourier dönüşümlü spektrometreler icat edilmiştir. Bu buluşun yanında matematiksel Fourier analizlerinin sisteme entegrasyonunun da sağlanmasıyla, IR spektrumunun kalitesinde ve veri elde ediliş hızında kayda değer bir gelişme sağlanmıştır (Stuart 2000).

Moleküllerin çoğunluğunun radyasyon absorbe edebilen fonksiyonel grupları orta dalga boylu kızıl ötesi aralığında (4000 ile 400 cm^{-1}) yer almaktadır. Bu sistemde ışığın dalga boyu karşılıkları, dalga numaraları olarak belirlenmekte (cm^{-1}) ve analizler bu verilerden yola çıkılarak yapılmaktadır. Kaplama materyalinde bulunan moleküllerin tanımlanabilmesi amacıyla, absorbsiyon bölgelerinin pozisyonları, yoğunlukları ve oluşan piklerin yarı maksimumdaki genişliklerinin incelenmesi gerekmektedir (Feddes ve ark 2009).

Kızılötesi spektrometrisinin en belirgin limitasyonu, simetrik halde bulunan moleküllere, soygazlara ve suda çözünmüş tek atomlu yapılara karşı hassas olmamasıdır. Ayrıca çok kompleks yapıların analizinde, kızılötesi bantların üst üste binebilmesi sebebiyle kızılötesi spektrumun incelenmesi zor bir hale gelebilmektedir (Feddes ve ark 2009).

Fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopiyle, organik moleküller (Yang ve ark 2015), kalsiyum fosfat kristal yapılarıyla (Arias ve ark 1998) ilaç taşıyıcı sistemlerin incelenmesinde (Wang ve ark 2015) ve besin ürünleri analizinde (Snehalatha ve ark 2009) kullanılmaktadır.

Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi, bir materyalin monokromatik ışığa maruz bırakılan moleküllerinden yansıyan ışıktaki enerji değişikliklerini gözlemleyerek, materyalin moleküler yapısı hakkında fikir sahibi olunmasını sağlayan bir inceleme yöntemidir. Bu yöntemde monokromatik ışık kaynağı olarak sıklıkla farklı dalga boylarına sahip lazerler kullanılmaktadır. Raman etkisi prensibinden yola çıkılarak geliştirilen bu sistemde incelenen materyallerin kalitatif analizleri, fonksiyonel grup tanımlamaları, moleküllerinin yapısal özellikleri incelenebilmektedir (Loudon 1964, Gardiner 1989).

Bu yöntemle ürüne zarar vermeden, ürün kalitesi ve kompozisyonu; sıcaklık, basınç ve stresin materyal üzerindeki etkileri incelenebilmektedir (Gardiner 1989). Ayrıca bu yöntemle sıvı içerisinde yer alan materyallerin incelenebilmesi de kızılötesi spektroskopiye göre avantaj sağlamaktadır (Bhattacharjee ve ark 2015).

Raman spektroskopisi yöntemi, kemiğin yapı ve kompozisyonunun incelenmesinde (Mandair ve Morris 2015), ilaç araştırmalarında (Vicario ve ark 2015), kalsiyum fosfat kristallerinin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde (Rakngarm Nimkerdphol ve ark 2014), mikrobiyolojik çalışmalarda (Samek ve ark 2014) ve kanser araştırmalarında (Sahu ve ark 2015) uygulanmaktadır.

X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi

X-Işını fotoelektron spektroskopisi, örneklerin yüzeye yakın bölgelerindeki elementlerin nitelik ve nicelikleri hakkında bilgi veren kimyasal bir analiz yöntemidir. Bu yöntem fotoelektrik etki prensibinden yararlanmaktadır. Bu prensibe göre, yeterli enerjiye sahip X-Işını fotonlarına maruz bırakılan materyal yüzeyindeki atomlar, belirli bir kinetik enerjiyle fotoelektronlar yaymaktadırlar. Yayılan bu fotoelektronların kinetik enerji değerleri üzerinden ölçüm yapılarak materyalin kimyasal yapısı hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Bu yöntemle yüzeyden en fazla 10 nanometre (nm) derinliğe kadar ölçüm yapılabilmektedir. Bu nedenle daha kalın kaplama materyallerinin incelenmesinde kullanımı amaçlandığında, kaplama materyalinin yüzeyinde kontrollü bir erozyon yapılarak, kaplama bütünlüğünün bozulması ve daha derin yüzeylere ulaşılması gerekmektedir (Feddes ve ark 2009).

X-Işını fotoelektron spektroskopisi, farklı kaplama materyallerinin kimyasal yapısını incelemede kullanılmaktadır (Boyd ve ark 2015, Lavkova ve ark 2015, Poth ve ark 2015).

X-Işını Kırınımı Analizi (XRD)

X-Işını kırınım analizi yöntemi farklı materyallerin nitelik ve nicelik yönünden incelenebilmelerine olanak sağlayan, işlem esnasında materyale zarar vermeyen bir yöntemdir. Bu yöntemde incelenecek materyallerin kristal yapıya sahip olması gerektiğinden, bu teknik sıvı örnekleri gibi çeşitli organik materyallerin incelenmesinde uygun değildir. Ancak incelenmesi uygun görünmeyen materyallerin kristal haldeki türevleri, sahip oldukları benzer karakteristik özellikleri sayesinde bu yöntemle incelenebilmektedir (Ryland 1958).

Günümüzde bu yöntemle katı materyallerin ve ince film şeklindeki kaplama yüzeylerinin kristallografik yapısı, kimyasal kompozisyonu ve fiziksel özellikleri hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir.

1.6.2. Mikroskobik Yöntemler

Tarama Elektron Mikroskobu (SEM)

Tarama elektron mikroskobunun geliştirilmesiyle, 1950' lerin başından itibaren, tıp ve fizik alanıyla ilgili bilim dallarında yeni araştırma alanları ortaya çıkmıştır. Tarama elektron mikroskobunda, elektron tabancasından çıkan elektronlar, yüksek voltaj altında hızlandırılarak çeşitli elektromanyetik lenslerin de yardımıyla, numune yüzeyine odaklanmaktadır. Bu işlem cihaz içerisinde yer alan saptırma bobinleri yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Numunenin yüzeyinden yansıyan elektronların meydana getirdiği sinyaller ise uygun dedektörler vasıtasıyla bir araya getirilip, güçlendirilmiş bir halde katot ışın tüpünde görüntülenmektedir. Numune yüzeyinden yansıyan sekonder elektronlardan alınan bilgi neticesinde, numunenin yüzey morfolojisi hakkında yüksek çözünürlükte görüntü alınabilirken; yansıyan geri saçılan elektronlar vasıtasıyla da, numunenin elemental değişkenleri hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Bu sistemde numune yüzeyine gönderilen hızlandırılmış elektronlar, numune yüzeyinde elektriksel olarak negatif yüklenmeye neden olmaktadırlar. Meydana gelen yük değişimi, gönderilmekte olan elektronların

sapmasına ve elde edilen görüntüde distorsiyona sebep olmaktadır (Yük etkisi). Bu durumun etkilerini en aza indirebilmek amacıyla, kalsiyum fosfat kaplı yüzeyler, polimerler ve biyolojik materyaller inceleme öncesinde yaklaşık 10 nm kalınlığındaki karbon veya altın iletken yüzeyle kaplanmaktadır. Ayrıca konvansiyonel tarama elektron mikroskoplarında, elektronların numune yüzeyine ulaşmadan önce ortam şartlarından etkilenmemeleri amacıyla işlem vakumlu ortam içerisinde sürdürülmek zorundadır. Bu zorunluluk sebebiyle, numune içerisinde bulunabilen ve yüksek vakumlu ortamda buharlaşabilen materyallerin, inceleme öncesinde numuneden uzaklaştırılması gerekmektedir. Uzaklaştırılması gereken materyaller genellikle biyolojik ürünler, su ve çeşitli çözücü materyallerden oluşmaktadır (Feddes ve ark 2009).

Literatür incelendiğinde, kalsiyum fosfat kaplamalarının yapı ve morfolojilerinin incelenmesinde tarama elektron mikroskobu analizi sıklıkla kullanılmaktadır (Fernández-Pradas ve ark 2001, Fernández-Pradas ve ark 2002). Bununla birlikte elde edilen kaplama materyallerinin çeşitli fizyolojik koşullar altındaki çözünmeleri (Clèries ve ark 1998), kaplama yüzeyinde hücre kültürü sonrasında oluşan kemik matriksinin değerlendirilmesi (Clèries ve ark 2000) ve biyomimetik kaplama tekniklerinin sonuçlarının irdelenmesi amacıyla da sıklıkla başvurulan bir analiz yöntemidir (Habibovic ve ark 2002, Barrere ve ark 2003b, Tas ve Bhaduri 2004).

Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektroskopisi

Bu sistem tarama elektron mikroskobuna takılan bir analiz sistemidir. Materyal içerisinde bulunan atomların elektronları farklı enerji seviyelerine sahiptir. Elektron tabancasından çıkan yüksek enerjili elektronları, incelenen materyalin yüzeyine penetre olduğunda, materyalin atomlarında meydana gelen iyonizasyona bağlı olarak, atoma ait farklı enerji düzeylerine sahip elektronlar yayılmaktadır. Böyle bir durumda atomda meydana gelen kararsız yapıyı bertaraf etmek için, daha yüksek enerji seviyesine sahip elektronlar hızlı bir şekilde, yayılan elektronlardan kalan daha düşük enerji seviyesine sahip yörüngeleri doldurmaktadır. Bu esnada atoma ait her iki enerji seviyesi arasındaki enerji farkı, X-Işını olarak yayılmaktadır. Yayılan X-Işınının sahip olduğu enerji düzeyi, enerji yayan atomun, hangi elemente ait olduğu hakkında bilgi

vermektedir. Bu sebeple yayılan X-ışınları belirlenip enerji dağılımı ve dalga boyu dağılımı incelenerek, materyalin kimyasal içeriği hakkında fikir sahibi olunabilmektedir (Shindo ve Oikawa 2002).

Enerji dağılımı yönüyle X-ışınları saçılımı analizi (EDX) ve dalga boyu dağılımı yönüyle de dalga boyu dağılım spektrometresi (WDS), elementleri belirlemede hızlı ve etkin bir metot olarak kabul görmektedir (Shindo ve Oikawa 2002).

Geçirim Elektron Mikroskobu (TEM)

Geçirim elektron mikroskobu, hızlandırılan elektron demetlerinin, incelenen materyalin atomik özelliklerine bağlı olarak numune içinden geçip geçmemesinden yararlanarak, materyalin görüntüsünün elde edilmesini sağlayan bir inceleme yöntemidir. Bu işlem sırasında elektromanyetik lenslerin yardımıyla numune içinden geçen elektronlar, odaklanarak düzenli bir biçimde kaydedilmekte ve görüntü elde edilebilecek hale getirilmektedir. Bu sistemin en önemli avantajı; incelenen materyale ilişkin elektron mikroskobu görüntüsü elde edilebilirken, aynı bölgeye ait kırınım modellemesi de yapabilmesidir. Günümüzde kullanılan geçirim elektron mikroskopları 0,1 nm' den daha küçük çözünürlüklerde işlem yapabilmektedir. Bu tekniğin en önemli dezavantajı, materyallerin yöntemin uygulanabileceği hale getirilmesindeki zorluktur. Bu sistemde incelenecek numunenin çok ince olması veya inceltilmiş olması gerekmektedir ve bu işlem zaman alıcıdır (Feddes ve ark 2009). Numuneler ancak bu işlem sonunda elektronları geçiren bir özelliğe sahip olabilmektedirler. Genellikle numunenin ne kadar inceltilmesi gerektiği, uygulanan elektron enerjisine ve numunenin içeriğindeki atomların, atom numaralarına bağlıdır. Genel bir kanı olarak daha ince numunelerin, daha kolay incelendiğine dair bir ortak görüş olmasına rağmen; 100 nm' nin altındaki kalınlıklar geçirim elektron mikroskopları ile numune incelemede yeterli görülmektedir (Williams ve Carter 1996).

Ayrıca incelenen materyalin çok yüksek çözünürlükte görüntüleri elde edildiğinde; çok küçük bir bölümü incelenebilmektedir. Bu sebeple, daha geniş alanı gösterebilen ancak daha düşük çözünürlükte görüntü verebilen sistemlerin

kullanılmasından sonra, bu mikroskopik tekniğin kullanılması önerilmektedir (Williams ve Carter 1996).

Bu inceleme yönteminin kalsiyum fosfat kaplamalarının karakterizasyonunda, tarama elektron mikroskobu, X-Işını kırınımı analizi ve X-Işını fotoelektron spektroskopiyle birlikte kullanıldığı rapor edilmektedir (Zhang ve ark 2005). Ayrıca farklı doku ve organların incelenmesinde (Hani ve ark 2014), farklı kristal yapılara sahip olan kalsiyum fosfat seramiklerinin canlı kemikle ilişkisinin değerlendirilmesinde (Kitsugi ve ark 1995) geçirim elektron mikroskoplarından faydalanılmaktadır.

Günümüzde teknolojik olarak hem kalsiyum fosfat seramikleriyle yapılan kaplamaların incelenmesi için geliştirilen teknikler ve hem de hazırlanan kaplamaların karakterizasyonu yöntemlerinde büyük ilerleme kaydedilmiştir. Kalsiyum fosfat seramiklerinin kristal yapısı, termodinamik özellikleri ve faz ilişkileri hakkında geniş bilgi sahibi olunmasına rağmen; kristalizasyon oranı, morfoloji kontrolü, diğer iyonik ve biyomoleküler yapılarla olan etkileşimleri günümüzde halen yeterince anlaşılamamıştır. Seramiklerin yapıları ve biyolojik ortamlarda çözünme özelliklerinin daha iyi anlaşılmasıyla, kemik ve dişlerin yerine geçebilecek biyomateryallerin geliştirilebilmesinin de önü açılacaktır (Dorozhkin ve Epple 2002). Geliştirilen yeni kaplama teknikleri sayesinde kaplama kalınlıkları daha etkin bir biçimde kontrol edilebilmektedir. Daha ideal kaplama yüzeylerinin geliştirilmesi, yeni uygulamaların ortaya çıkmasına ve performansı arttırılmış yeni tıbbi ekipmanların geliştirilebilmesine olanak sağlayacaktır (León 2009).

1.6.3. Histolojik Yöntemler

Günümüzde, kemiğe yerleştirilen biyomateryallerin doku içerisinde meydana getirdiği hücresel değişikleri incelemenin en ideal yolu, histolojik değerlendirme yöntemleridir. Kemik dokusu histolojik olarak değerlendirildiğinde; meydana gelen sekonder kırık iyileşmesinin, 4 temel aşamada gerçekleştiği görülmektedir;

Birinci aşamada; ilk inflamatuar cevabı takiben, kırık hematomu oluşmaktadır. Mezenşimal kök hücrelerin (stem cell) aktivasyonu gerçekleşmektedir.

İkinci aşamada ise; oluşan fibröz kallusta, endokondral ve intramembranöz kemikleşme ve damarlanma görülmektedir. Mezenşimal kök hücreleri ise, kondroblast ve osteoblastlara differansiye olmaktadır. Ortamdaki kondroblastlar, mekanik özelliği arttıracak olan tip II kollagen ve proteoglikanları üretmektedirler. Daha sonra, osteojenik aktivite gösteren mezenşimal kök hücrelerin kartilaj dokusunda meydana getirdiği mineralizasyon sonucunda süngerimsi kemik dokusu oluşumu gerçekleşmektedir. Bu sırada osteoblaslar, yeni kollagenöz organik matriks sentezleyerek, kemikteki mineralizasyonu düzenlemektedirler. Organik yapıdaki ekstraselüler matriks, kollagen, glikoprotein, hyaluronik asit ve proteoglikanları içermesi yanında, hücreler, büyüme faktörleri ve sitokinler için temel yapı görevi de görmektedir.

Üçüncü aşamada ise; daha yumuşak bir vaziyetteki kallus, ortamda bulunan kondroklast hücreleri tarafından rezorbe edilmektedir. Osteogenezis sonucunda ise sert ve daha dayanıklı kallus formasyonu gerçekleşmektedir.

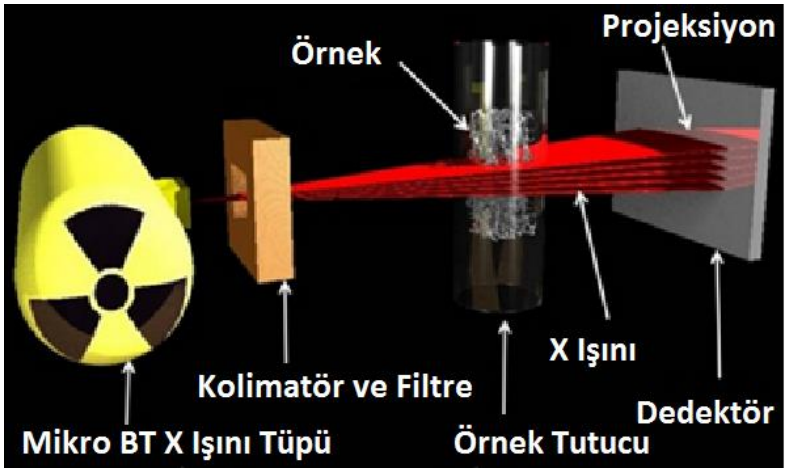
Dördüncü aşamada da; osteoblast, osteoklast ve endoteliyal hücrelerin aktivasyonuyla, süngerimsi kemik rezorbe olarak yerini kortikal ve trabeküler kemiğe bırakmaktadır (Ai-Aql ve ark 2008, Schindeler ve ark 2008, Marsell ve Einhorn 2011).

İmplant çevresi kemik dokusunun ışık mikroskobuyla incelenmesinde, non-kalsifiye histomorfometri (Liu ve ark 2012) veya dekalsifiye histomorfometriden (Athraa ve ark 2008, Yamaki ve ark 2012) yararlanan çalışmalar bulunmaktadır.

İmplant çevresindeki dokunun değerlendirilmesinde, araştırmacılar ışık mikroskobunun yanı sıra, geçirim ve tarama elektron mikroskobundan da faydalanmaktadırlar. Uygun boyama teknikleri kullanılarak elde edilen preparatlar ışık mikroskobuyla incelenerek, implantların osseointegrasyon düzeyleri hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Tarama ve geçirim elektron mikroskopları ise; daha yüksek çözünürlüğe sahip görüntüler elde edebilmektedir. Bu sayede kemik ve implant arasındaki ilişki, hücresel aktivite daha belirgin olarak izlenebilmektedir. Bu tekniklerin her birinde yeni oluşan kemik dokusu ve hali hazırda ilgili bölgede var olan olgun kemik dokusuna ait görüntüler elde edilebilmektedir (Trire ve ark 2010).

1.6.4. Mikrotomografi Yöntemi

Mikrotomografi sistemi ilk defa Feldkamp ve ark (1989) tarafından tarif edilmiştir. Bu sistemde mikro odaklı X-Işını kaynağından çıkan ışınlar, kendi ekseni etrafında belirli bir hızda dönen numuneye yönlendirilmektedir. Numune yüzeyinden geçen X-Işınları daha sonra karşı tarafta yer alan dedektör yardımıyla toplanmaktadır. Dedektörün bağlantılı olduğu CCD kamera sistemi X-Işınlarını görünür ışığa çevirmektedir. Dedektörden alınan bilgilerle elde edilen 2 boyutlu slaytlar, sırasıyla bir araya getirilerek bilgisayar ortamında depolanmaktadır. Elde edilen işlenmemiş bu veri çeşitli yazılımlar vasıtasıyla işlenerek, numuneye ait 3 boyutlu görüntü elde edilebilmektedir (Şekil 1.2).



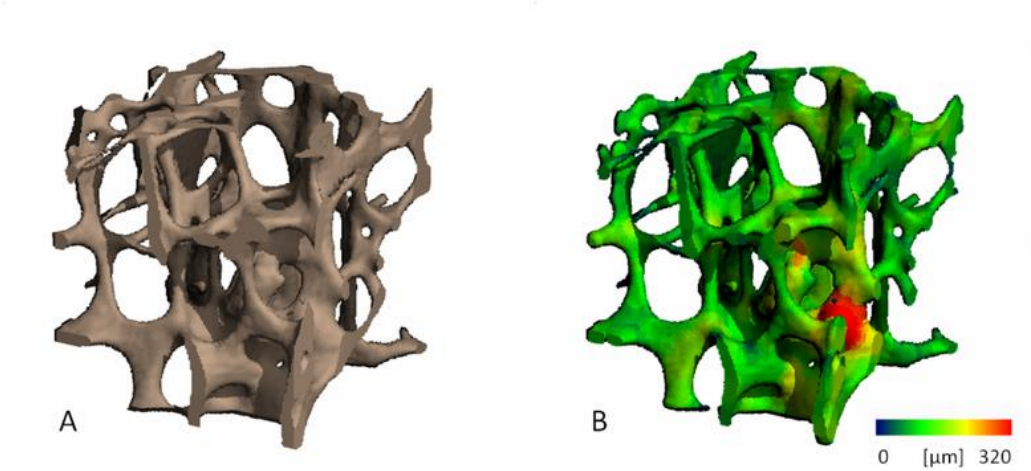
Şekil 1.2. Mikrotomografi sisteminin işleyişi (Bcube 2015a).

Kısaca anlatılan bu yöntem, numune üzerinde olumsuz etki yaratmamakta ve histolojik değerlendirmeyle birlikte kullanılabilmektedir. Sahip olduğu bu avantaj neticesinde, diş minesi kalınlığı ölçümlerinde (Olejniczaka ve Grineb 2005, Olejniczak ve Grine 2006), pulpa kavitesinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesinde (Oi ve ark 2004), kök kanal preparasyonlarının incelenmesinde (Bergmans ve ark 2001), iskeletsel gelişim aşamalarının ve konjenital malformasyonların incelenmesinde (Guldberg ve ark 2004), çeşitli ilaçların periodontitis üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde (Luan ve ark 2008), implant çevresi kemik dokusunun değerlendirilmesinde (Rebaudi ve ark 2004) mikrotomografik yöntemden yararlanılmaktadır.

Mikrotomografi yöntemiyle implant çevresindeki dokusunun incelenmesi sonucunda trabeküler kalınlık (Tra. K.), trabeküler boşluk (Tra. B.), trabekül sayısı (Tra. S.), kemik hacmi yoğunluğu veya kemik hacmi/toplam doku hacmi oranı (Kh/Th), kemik yüzey yoğunluğu (Ky/Th), kemik mineral yoğunluğu (KMY), gibi çeşitli parametreler elde edilmektedir. Bu parametrelerin değerlendirilmesiyle, kemikle implant arasındaki ilişkinin düzeyi, implant çevresi dokusundaki kemik hacmi ve niteliği hakkında fikir sahibi olunabilmektedir (Odgaard 1997, Zhang ve ark 2013). Kemiğe yerleştirilen implantların osseointegrasyon süreci, mikrotomografik olarak elde edilen verilerden yola çıkılarak takip edilebilmektedir (Fang ve ark 2014). Yapılan in vivo çalışmalarda (Liu ve ark 2012, Zhang ve ark 2013), implant çevresi kemiğe ait mikrotomografik verilerin, histomorfometrik incelemeyle ve sökme torku testiyle elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmektedir.

Trabeküler Kalınlık (Tra K.)

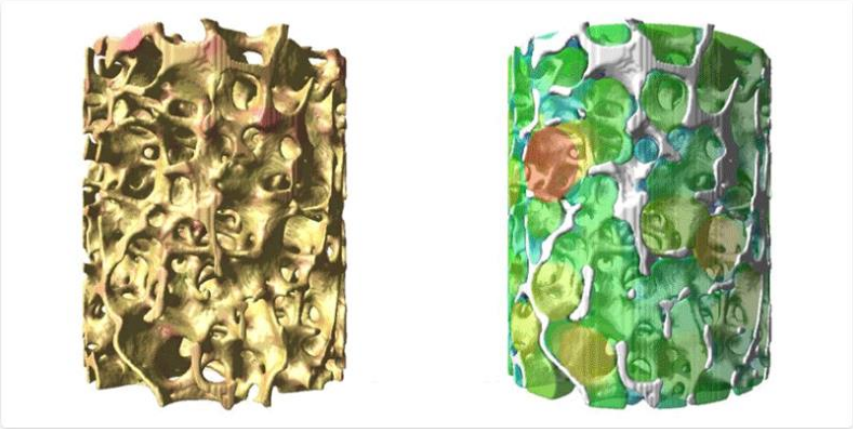
Kemiğin doğal bir ağ şeklindeki trabeküler yapısı, ona maruz kaldığı kuvvetler karşısında dayanıklılık sağlamaktadır. Kemiğin maturasyonu sırasında, trabeküler kalınlıktaki artışla beraber kemiğin mineralizasyonunda da artış oluşmaktadır. Trabeküler yapının mekanik özellikleri, trabeküler kalınlığa ve mineral dengesine göre belirlenir (Swartz ve ark 1998). Mikrotomografik incelemede, incelenen kemik yapının ortalama kalınlığından yola çıkılarak, tahmini ortalama trabeküler kalınlık değeri hesaplanmaktadır. Bu işlemin basamakları Hildebrand ve Rüegsegger (1997), Remy ve Thiel (2002) tarafından tanımlanmıştır. Üç boyutlu analizi yapılan yapının içerisindeki belirli bir alanda yer alan trabeküler yapının içerisine, etrafı tamamıyla kemikle çevrelenebilen, maksimum sayıda küçük kürecikler yerleştirilerek ölçüm yapılmaktadır. Daha sonra elde edilen değerler, Remy ve Thiel (2002) tarafından tanımlanan mesafe dönüştürücü yöntemle, mikrotomografi analiz programının inceleyebileceği formata dönüştürülmektedir (Şekil 1.3) (Bcube 2015b, Bruker MicroCT 2015, MicroCT World 2015a)



Şekil 1.3. Kemiğin trabeküler yapısı ve trabeküler kalınlık renk kodlaması (MicroCT world 2015a).

Trabeküler Boşluk (Tra. B.)

Trabeküler boşluk, trabeküler kalınlığın hesaplandığı yöntemle hesaplanmaktadır ve incelenen bölgedeki kemik içermeyen alanlar hakkında bilgi veren bir parametredir. Mikrotomografik incelemede, trabeküler yapıyla iç içe geçmiş kemik iliği kavitelerinin ortalama kalınlığı, trabeküler boşluk olarak ifade edilebilmektedir (Şekil 1.4). Hesaplamada trabeküller arasında kalan kısımlara yerleştirilen maksimum sayıdaki küreciklerden yararlanılmaktadır (Boyd SK, 2009, Bcube 2015b, Bruker Micro CT 2015, MicroCT world 2015a).



Şekil 1.4. Trabeküler yapı (solda) ve trabeküler boşluk (sağdaki yeşil bölge) (MicroCT world 2015a).

Trabekül Sayısı (Tra. S.)

Bu ölçüm değeri birim ünite başına düşen trabeküllerin sayısını belirtmektedir ve elde edilen ölçüm değerleri mm^{-1} cinsindendir. Yapılan inceleme sonucunda, kemik içerisinde yer alan tahmini trabekül sayısı hakkında bilgi sahibi olunmaktadır (Boyd SK, 2009).

Kemik Hacmi Yoğunluğu (Kh/Th)

Mikrotomografik analizlerde sıklıkla başvurulan bir incelemedir. İncelenen alandaki mineralize kemik bölgesine karşılık gelen hacmin, incelenen toplam hacme bölünmesiyle elde edilmektedir ve yüzde (%) olarak ifade edilmektedir. Bu veri sıklıkla trabeküler yapının belirgin olduğu dokularda daha ideal sonuç verebilen bir parametredir (Boyd SK, 2009, Bruker Micro CT 2015, Micro Ct World 2015b).

Kemik Yüzey Yoğunluğu (KYY)

İncelenen bölge içerisindeki her bir mm^3 toplam doku hacmine düşen, mm^2 cinsindeki kemik yüzey alanı ise kemik yüzeyi yoğunluğu (Ky/Th) olarak isimlendirilmektedir. Yapılan hesaplama sonucunda elde edilen veriler mm^{-1} cinsindendir (Parfitt ve ark 1983). İncelenen yapının sahip olduğu kalınlık ve kompleksite hakkında bilgi veren kullanışlı bir parametredir (Bruker Micro CT 2015). Trabekül sayısı ve hacmindeki artıştan olumlu yönde etkilenmektedir (Nafei ve ark 2000).

Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY)

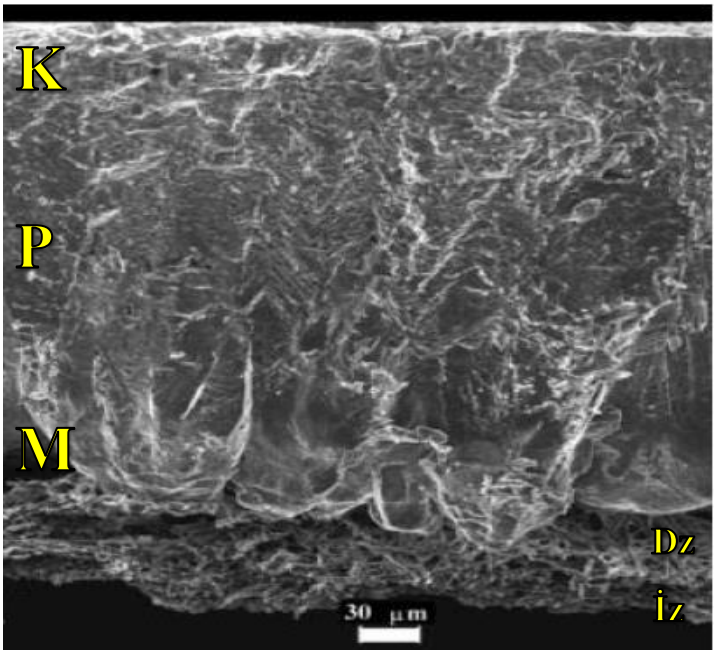
Kemik mineral yoğunluğu ise kemiğin dayanıklılığı hakkında bilgi veren ve kemikteki kalsiyum miktarını ortaya koyan bir parametredir. Bu ölçüm sonunda elde edilen veriler mg/cm^3 olarak ifade edilebilmektedir. Kemik mineral yoğunluğunun hesaplanmasında farklı yoğunluğa sahip HA eşdeğeri materyaller kullanılarak kalibrasyon yapılmaktadır. Kalibrasyon materyali fantom olarak isimlendirilmektedir. Tomografik incelemeden elde edilen görüntüler, kalibre edilmiş fantomlarla karşılaştırılarak, numuneye ait kemik mineral yoğunluğu değerleri hesaplanmaktadır (Engelke ve ark 2013, Medicinenet 2015).

1.7. Kanatlı Hayvan Yumurtası Temelli Ürünler

Kanatlı hayvanların yumurta içeriği, yumurta kabuğu ve kabuk zarıyla sarılıdır. Yumurta kabuğu ve kabuk zarı birlikte, yumurtanın toplam ağırlığının yaklaşık % 10' unu oluşturmaktadır (Hincke ve ark 2010).

1.7.1. Yumurta Kabuğu

Kanatlı hayvanların yumurta kabuğu mikroskobik olarak incelendiğinde, dıştan içe doğru 5-50 μm kalınlıktaki kütiküla tabakası, pallizad tabakası (1800 μm) ve mamillar tabaka (800 μm) olmak üzere üç katmandan oluşur (Şekil 1.5) (Dennis ve ark 1996). Kompozit yapıdaki bu materyalde genel olarak kalsiyum karbonat (%94), magnezyum karbonat (%1), kalsiyum fosfat (%1) ve organik maddeler (%4) bulunmaktadır (Rivera ve ark 1999). Devekuşu yumurtasıysa, kristal tabakası daha farklı bir morfolojik yapıya sahip olduğundan mekanik dayanıklılığıyla öne çıkmaktadır. Yapılan incelemede kütikülanın ve pallizad tabakasında yüksek miktarda kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) kalsit formunda bulunmaktadır ve içten dışa doğru gidildikçe kalsit miktarında artış gözlenmektedir. Kütiküla tabakası kendi içerisinde iç ve dış kütiküla olarak 2' ye ayrılmaktadır. İç kütiküla tabakası mineralizasyon yönüyle zengindir ve hidroksiapatit kristalleri içermektedir (Dennis ve ark 1996). Kabukta yer alan kalsit kristalleri, kabuk yüzeyine paralel doğrultuda yönlenmekte ve birkaç mikrometre kalınlığında kristal kümecikleri oluşturmaktadır (Feng ve ark 2001). Yumurta kabuğunu oluşturan tabakalarda çok sayıda delikçik (por) bulunmaktadır. Bu porlar gaz ve su buharı geçirgenliğine olanak sağlamaktadır (Rahn ve Paganelli 1982).



Şekil 1.5. Yumurta kabuğunun tabakaları ve yumurta kabuğu dış (Dz) ve iç (İz) zarı: K: Kütiküla tabakası, P: Pallizad tabakası ve M: Mamillar tabaka (Arias ve ark 2008).

Devekuşu yumurta kabuğunun in vivo ortamda rezorbe olabilen bir materyal olduğu belirtilmekle birlikte, bu materyalin rezorbsiyon hızının partikül büyüklüğü ile ters orantılı olduğu rapor edilmektedir (Dupoirieux ve ark 2001). Ayrıca devekuşu yumurta kabuğu canlı dokuda immün reaksiyona ve enfeksiyona sebebiyet vermeyen, kolay şekillendirilebilen ve yapısal olarak sağlam bir materyaldir (Uygur ve ark 2011).

Tavuk yumurtası kabuğundan elde edilen ve poröz yapıda HA içeren kemik greftlerinin, deneysel amaçla oluşturulan kemik defektlerinin tamirinde kullanılabileceği ve osteokondüktif özellik taşıdığı gösterilmiştir (Park ve ark 2009). Bununla beraber, tavuk yumurta kabuğundaki doğal kalsit kristallerinin hidrotermal işlemden geçirilmesiyle, kalsiyum yetersiz HA kristalleri içeren yeni bir greft materyalinin elde edilebildiği rapor edilmektedir ve söz konusu materyalin HA kristallerine göre biyolojik ortamda daha hızlı rezorbe olabilmesi nedeniyle, kemik grefti olarak kullanımı konusunda avantaj sağlayabileceği ileri sürülmüştür (Park ve ark 2008). Ayrıca mikrodalga yöntemiyle, doğal kalsitten temel alan, çinko içerikli kalsiyum yetersiz HA kristalleri elde edilebilmektedir. Bu içeriğe sahip olan kemik greftlerinin osteokondüktif özelliklerinin yanı sıra antibakteriyel özellik taşıdığı da belirtilmektedir (Cai ve ark 2012). Yumurta kabuğundan elde edilen greft materyali,

tavşan kafatası modelinde başarıyla uygulanabilmekte ve kemik iyileşmesine olumlu yönde katkı sağlayabilmektedir (Durmus ve ark 2003). Ayrıca kabuktan elde edilen kalsiyum yetersiz HA, kadmiyum, bakır ve kurşun gibi ağır metallere karşı yüksek afinite göstermektedir. Çeşitli solüsyonlara karışan ağır metallerin ortamdan uzaklaştırılmasında doğal bir filtre işlevi gören uygun bir materyaldir (Zheng ve ark 2007, Liao ve ark 2010).

Yumurta kabuğu doğal bir kalsiyum deposudur ve kalsiyuma ek olarak selenyum, flor ve stronsiyum da içermektedir. Yumurta kabuğu tozunun gıda takviyesi olarak kullanımı, kemik kaybının telafisinde olumlu etki göstermektedir. Osteoporöz veya osteopeni hastası post menapozal dönemdeki kadınlarda, yumurta kabuğundan elde edilen kalsiyumun günlük tüketiminin, kalça ve bel bölgesindeki kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı bilinmektedir (Schaafsma ve Pakan 1999).

1.7.2. Yumurta Kabuğu Zarı (ESM) ve Zar Proteini (SEP)

Yumurta kabuk zarı yumurta kabuğunun altında yer alır ve iki kattan oluşur. Dış ve iç zar olarak ikiye ayrılan kabuk zarlarından dıştaki, yumurta kabuğu ile bağlantı halinde olup daha kalındır (Şekil 1.6), (Nakano ve ark 2003). Bu yapı, yumurta kabuğuna benzer por özelliklerini taşımaktadır ve yaklaşık 80 µm kalınlığa sahiptir (Arias ve ark 1991, Tsai ve ark 2006). İç zar ise yaklaşık olarak 15 ila 26 µm kalınlığa sahiptir (Liong ve ark 1997). Yapılan mikroskobik incelemede; birbiriyle iç içe geçmiş, karmaşık bir ağ şeklindeki iplikçiklerden (fibril) oluştuğu ve dış zara ait kalın ipliklerin, daha ince olan iç zara nüfuz ettiği gözlenmiştir. Ayrıca bu çift katlı zarın tip I, tip V ve tip X kollagenleri, ihtiva ettiği belirtilmektedir (Wong ve ark 1984, Arias ve ark 1991, Nys ve ark 2001). Tip I kollagen, çift katlı yumurta kabuk zarının kalın olan dış zarında daha fazla bulunurken; tip V kollagen iç zarda daha fazladır (Wong ve ark 1984). Ayrıca zarın dış katmanı daha kalın ve daha fazla sayıda iplik içerdiğinden, daha girintili çıkıntılıdır; iç katman ise oldukça düzgün bir yüzeye sahiptir. Dıştan içe doğru gidildikçe ipliklerin inceldiği görülmektedir. Sahip olduğu bu morfolojik özellikler, yumurta kabuk zarının mekanik özelliklerini belirler (Zhou ve ark 2011). Kabuk zarının iç katmanındaki ipliklerde kalsifikasyon görülmemekle birlikte; dış zardaki ipliklerin yumurta kabuğu ile ilişkili olan kısımları, kısmi olarak

kalsifiye durumdadır. Bu iplikler, yumurta kabuğunun mamillar tabakasıyla bağlantı halindedir (Arias ve ark 1993).



Şekil 1.6. Devekuşu yumurta kabuk zarı.

Kabuk zarında (Wong ve ark 1984) ve canlı dokuların temelinde yer alan kollagen, sahip olduğu biyouyum, biyoçözünürlük ve yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle doku mühendisliğinde ve ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan bir materyaldir (Friess 1998). Günümüze değin tanımlanan kollagen çeşitleri içerisinde tip I kollagen ve daha az miktardaki tip V kollagenin meydana getirdiği temel ipliksel yapı, canlıların kemik dokusunun organik matriksinin temelini oluşturmaktadır. Ekstraselüler matriksteki kollagen moleküllerinin organize olmasıyla şekillenen bu yapı, 10-300 nm arasındaki kalınlığa sahip olan kollagen ipliklerden oluşur (Alberts B ve ark 2002). Memelilerin kemik dokusunun mineralizasyonu sırasında ekstraselüler matriksteki kollagen iplikleri, üzerlerine çökelen kalsiyum fosfat kristalleriyle beraber kemik formasyonunda görev almaktadırlar (Nyman ve ark 2005). Tip X kollagenin ise biyomineralizasyon üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Arias ve ark 1991). Kabuk zarından elde edilen kollagen üzerinde yapılan testler sonucunda, diğer kollagen kaynaklarına göre daha düşük otoimmün ve alerjik reaksiyona neden olduklarına kanaat getirilmiştir. Bu yönüyle incelendiğinde, yumurta kabuk zarı; biyomedikal, kozmetik ve gıda endüstrilerinde güvenle kullanılabilecek bir üründür (Long ve ark 2005).

Yumurta kabuk zarı, sahip olduğu kollagen iplikler ve ilişkili glikoproteinlerle birlikte gözenekli yapı oluşturmaktadır (Wong ve ark 1984). Bu ürün tıbbi alanda,

eklem ve bağ dokusu hastalıklarında ağrı ve hareket kısıtlılığının kontrolünde kullanılabilmektedir. İçerdiği doğal yapıdaki glikozaminoglikanlardan olan hyaluronik asit, eklem ve onu çevreleyen bağ dokusun sağlığının korunmasında olumlu etkiye sahiptir. Yumurta kabuk zarının, terapötik olarak günlük 500 mg kullanımının, eklem ağrısını 1 hafta içerisinde hızlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Bu materyalin gıda takviyesi olarak kullanımı, hastalar üzerinde olumsuz bir etki yaratmamıştır (Ruff ve ark 2009a), ayrıca bu materyal, laserasyonlarda yara örtü materyali olarak (Zadik 2007) kullanılmaktadır. Buna ek olarak, yumurta kabuk zarının 500 mg' lık preparatının 8 hafta boyunca kullanımının, osteoartritin sebep olduğu ağrı ve eklem kısıtlanmasının tedavisinde de kullanılabildiği gösterilmiştir. Preparatın 10 günlük kullanımı, ağrının kontrol altına alınmasında ve ortalama eklem kısıtlılığının azaltılmasında etkili olmaktadır (Ruff ve ark 2009b). Bu preparatın TNF-α üzerindeki baskılayıcı etkisiyse, in vitro bir çalışmada gösterilmiştir. Bu yönüyle değerlendirildiğinde, in vitro koşullarda hidrolize edilen, doğal yumurta kabuk zarı, antienflamatuar etkiye sahiptir (Benson ve ark 2012). Literatürde belirtilen olumlu özelliklere ek olarak yumurta kabuk zarının, hasar görmüş sinir uçlarının rejenerasyonunda da etkili bir biçimde kullanılabileceği savunulmaktadır. Deneysel olarak oluşturulan siyatik sinir hasarının tedavisinde, zardan elde edilen ve hasarlı sinir uçlarına rehberlik edebilen materyalin, otolog sinir greftine göre siyatik sinir fonksiyonlarının telafisinde olumlu rol oynadığı gösterilmiştir (Farjah ve ark 2013).

Farkmakoloji alanında ise; mikroküre ilaç taşıyıcı sistemlerine entegre edilen, asiklovir yüklenen yumurta kabuk zarının, biyo uyumlu olduğu ve in vivo ortamda ilacın gastrointestinal sistemdeki salınımı süresinin, bu teknik vasıtasıyla uzatılabildiği gösterilmiştir (Tao ve ark 2009).

Tıbbi alandaki kullanımının dışında, yumurta kabuk zarı, çeşitli kristal yapıların olgunlaştırılmasında ve kompleks bileşiklerin hazırlanmasında biyolojik bir şablon vazifesi görmektedir. Bir araya getirilmesi planlanan bu inorganik yapılar, kabuk zarının da yardımıyla birleştirilerek kompozit bir yapı elde edilmektedir. Daha sonra yumurta kabuk zarının kalsinasyon işlemiyle, zar yapısı ortadan kaldırılarak, daha yüksek kristalizasyona sahip inorganik yapıların ortamda kalması sağlanabilmektedir (Shao ve ark 2011).

Yumurta kabuk zarı yüzeyinde yüksek poröziteye sahip altın nanopartikülleri içeren zar benzeri bir yapı oluşturulabilmektedir. Bu işlem esnasında indirgeyici ek bir ajan kullanılmamaktadır. Elde edilen kompozit yapının morfolojik özellikleri pH' nın kontrol edilmesiyle ve yumurta kabuk zarının indirgenme ve yükseltgenme kapasitesiyle ilişkili olarak değişkenlik göstermektedir. Düşük pH değerlerinde altın nanopartiküllerine sahip daha kalın bir yüzey elde edilirken; yüksek pH' da daha ince ve seyrek kaplamaya sahip yüzeyler elde edilmektedir. Bu tür materyaller, biyosensörlerde, elektrotlarda, optik seçici kaplamalarda ve biyofiltrasyonda kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Ashraf ve ark 2013).

Yumurta kabuk zarının şablon olarak kullanılmasıyla farklı metalik elementlerin ötesinde, bazı başka bileşikler de sentezlenebilmektedir. Düşük sıcaklıktaki çinko oksit atomik tabaka depozisyonu yöntemiyle, makroporöz yapıdaki ZnO membranı, hazırlanabilmektedir. Bu işlemde kabuk zarı iç kısmı biyolojik ve doğal bir şablon olarak kullanılmaktadır. Elde edilen kompozit yapı, yüksek mekanik esnekliğe ve bakterisit etkinliğe sahiptir (Lee ve ark 2009).

Biyolojik bir şablon olarak kullanılabilen yumurta kabuk zarı, biyo mineralizasyon işlemi sırasında, kalsiyum karbonat kristallerinin oluşturulması amacıyla da kullanılabilmektedir. İn vitro ortamda amonyum karbonat ($(NH_4)_2CO_3$) içeren kalsiyum klorür ($CaCl_2$) solüsyonunda, 24 saat süreyle inkübe edilen, EDTA ile muamele edilmiş yumurta kabuk zarının dış yüzeyinde, kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) kristalleri içeren bir çökelme alanı elde edilebilmektedir. Elde edilen kristallerin genel boyutları 5 ila 10 μm arasında değişkenlik göstermektedir. Yapay bir biçimde elde edilen kristal yapı, doğal yollarla dekalsifiye olan yumurta kabuk zarında yer alan kalsit kristallerine benzerlik gösteren bir yapıdadır (Wu ve ark 1995).

Yumurta kabuk zarı, suya karışan çeşitli ağır metal iyonlarını ya da organik boyaları emebilen, biyolojik bir adzorban materyaldir. En yüksek emilim optimum ortam pH' nın 3 olduğu durumda sağlanabilmektedir. Altın, gümüş, kobalt, kurşun, bakır, nikel, çinko gibi metallerin emilimi bu malzemeyle gerçekleştirilebilmektedir (Ishikawa ve ark 2002).

Biyolojik bir şablon ve biyoadzorban bir materyal olarak kullanılabilen yumurta kabuk zarı, gerekli değişiklikler yapılarak, biyolojik bir sensöre

dönüştürülebilmektedir. Altın nano partiküllerinin ve glikoz oksidaz enziminin, yumurta kabuğu zarına adzorpsiyonuyla, çok hassas bir glikoz biyosensörü elde edilebilmektedir. Materyalin içerisine altın elementinin eklenmesiyle birlikte, sensörün kalibrasyon hassasiyetinin % 30 oranında arttırılabildiği; bu ürünün, insan kan serumundaki glikoz miktarının belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılabildiği rapor edilmektedir (Zheng ve ark 2011). Benzer bir yöntemle üretilen ancak daha düşük hassasiyete sahip başka bir glikoz biyosensörü de gıdalarda yer alan glikoz miktarının ölçümünde kullanılabilmektedir (Zhang ve ark 2011). Yine aynı şekilde glikoz oksidaz enzimi kullanılarak kabuk zarına adzorbe edilen ve altın yerine platin içeren bir başka biyosensör de, insan kan serumundaki glikoz miktarını ölçebilecek kalibrasyon hassasiyetine ulaşabilmektedir (Liu ve ark 2013).

Yumurta kabuk zarının sahip olduğu bakteriyolitik enzimler, Escherichia Coli ve Staphylococcus Aureus bakterilerinin de içinde bulunduğu gram pozitif ve gram negatif bakteri suşlarının, termal direncini değiştirebilmektedir. Bu yönüyle değerlendirildiğinde kabuk zarı antibakteriyel özellik göstermektedir. Kabuğun zar matriksi içerisinde yer alan çeşitli proteinlerin, bakterilerle etkileşime girerek, sahip oldukları zarın bütünlüğünü bozabildikleri savunulmaktadır (Poland ve Sheldon 2001, Mine ve ark 2003).

Kabuk zarının; fosfat iyonlarını, kalsiyum iyonlarına göre daha az geçirmesinden yararlanılarak, HA kristali sentezlenebilmektedir. İşlem sırasında HA prekürsörleri olarak bilinen, $CaCl_2.2H_2O$ (kalsiyum klorür dihidrat) ve $(NH_4)_2HPO_4$ (diamonyum hidrojen fosfat) kullanılmaktadır. Zarın sahip olduğu seçici geçirgen özellik; HA kristallerinin nükleasyonu ve gelişimini mümkün kılmaktadır. Ortam pH' sının arttırılmasıyla birlikte, iğne şeklindeki kristaller, oval şekildeki kristal yapılara dönüşmektedir (Neelakandeswari ve ark 2011).

E vitamininin yardımıyla bir araya getirilen polisakkarit ve protein içeren mikrokapsüller, yumurta kabuk zarının dış katmanına tutunabilmektedir. Elde edilen bu kompozit yapı, daha iyi bir kontrollü salınım özelliği göstermektedir. Ayrıca zararlı enzimlerin oluşturduğu yıkıcı etkilere karşı daha dayanıklı bir yüzey elde edilmektedir. Oluşturulan bu bağlanma, glutaraldehitle oluşturulan bağlanmadan iki kat daha güçlüdür (Chai ve ark 2013).

Ancak yumurta kabuk zarı, moleküler yapısındaki disülfit bağları nedeniyle çözülebilir özellikte olmadığından, üzerinde uygun fiziksel değişiklikler yapılamamaktadır. Bu durum materyalin uygulama alanlarını sınırlandırmaktadır (Yi ve ark 2004). Bu sebeple araştırmacılar yumurta kabuk zarından, çözünebilen yumurta kabuk zarı proteinini (SEP) elde edebilmek amacıyla çeşitli metotlar geliştirmişlerdir (Luliang 1995, Takahashi ve ark 1996). Luliang (1995) in metodunda genel olarak 100 gram kurutulmuş yumurta kabuk zarı, 150 mL %5' lik NaOH ile 500 mL etanol karışım içerisinde 60^0C sıcaklıkta 2 saat boyunca muamele ederek, ortaya çıkan materyalin pH' sı 7,2' ye ayarlanarak, istenilen konsantrasyonda kabuk zarı proteini elde edilmektedir. Takahashi ve ark (1996) ise bu yöntemden farklı olarak, kabuk zarını 25^0C' de 24 saat süreyle performik asitle okside etmiş ve takiben de 25^0C' de 24 ila 72 saat boyunca pepsinle muamele etmişlerdir. Daha sonra elde edilen materyal diyaliz ve liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem sonunda elde edilen kabuk zarı proteininde aminoasitlerin ve az miktarda sakkaritlerin yer aldığı gösterilmiştir. Yi ve ark (2003) ise 1,25 mol/L 3-merkaptopropionik asit ve %10 asetik asit kullanarak 90^0C' de 12 saat muamele sonucunda kabuk zarı proteini izole etmişlerdir. Yumurta kabuk zarındaki disülfit bağlarını yıkmak amacıyla bu işlemde 3-merkaptopropionik asitten yararlanılmıştır. İşlem sonucunda, %10'luk asetik asit solüsyonunda çözünebilen yumurta kabuk zarı proteini elde edilmektedir. Bu metotlar neticesinde elde edilen biyouyumlu ürünün istenilen şekle ve boyuta sokulabilmesi, suda çözünmesi ve biyoaktif bir materyal olarak kullanılabilmesinin önünü açmıştır.

Bir dizi işlem sonrasında elde edilen yumurta kabuk zarı proteini, yumurta kabuk zarıyla aynı aminoasitleri içermektedir. Her iki materyalin içerdiği aminoasitler kıyaslandığında, zar proteininde sadece sistein miktarının azaldığı görülmektedir. Bu durum merkaptopropionik asidin kimyasal yapısında yer alan –SH grubunun, sisteinin sahip olduğu S-S bağlarını kırarak yeni bir kimyasal yapı oluşturmasına bağlanmaktadır. Ayrıca X-Işını fotoelektron spektrum analizi yapılarak her iki materyalin kimyasal içerikleri incelendiğinde, karbon, azot ve oksijen miktarlarının benzer düzeyde olduğu; kükürt miktarının ise zar proteininde belirgin bir biçimde daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, merkaptopropionik asitle sisteinin kimyasal bir yapı oluşturduğu varsayımını destekler niteliktedir (Yi ve ark 2004).

Her iki materyalin, termal özellikleri, yüzey enerjileri ve kontakt açıları karşılaştırıldığında, genel olarak benzer termal özelliklere sahip oldukları sonucuna varılmakla birlikte; zar proteini, kabuk zarına göre biraz daha düşük sıcaklıklarda kütle kaybına uğramaktadır. Ancak kabuk zarı proteini, kabuk zarının her iki yüzeyiyle (iç ve dış yüzeyler) kıyaslandığında, daha düşük kontakt açılarına ve daha yüksek yüzey enerjisine sahiptir. Buradan yumurta kabuk zarı proteinin, daha hidrofilik bir yüzeye sahip olduğu sonucuna varılabilir (Yi ve ark 2004).

Yumurta kabuk zarı proteinin biyouyumu, tip I kollagenle in vitro ortamda karşılaştırılmıştır. Her iki materyal üzerine tutunan fibroblastların miktarı değerlendirildiğinde, ilk 4 saatlik sürede, zar proteini üzerinde daha fazla fibroblast görülmektedir. Ayrıca ilk 1 saat içerisinde kollagen yüzeyinde hiç hücre adezyonu ve proliferasyonu görülmemekle birlikte; zar proteinin yüzeyine, erken dönemde fibroblastlar tutunabilmektedir (Yi ve ark 2004).

Otoklavize yumurta kabuk zarı ile zar proteinin biyouyumluluğu kıyaslandığında ise; zar proteininde ve iç ve dış kabuk zarı yüzeylerinde, fibroblastların adezyonu ve proliferasyonu izlenmektedir. Ancak elde edilen veriler, zar proteininde belirgin bir şekilde daha yüksektir. Yumurta kabuk zarı proteini sahip olduğu yüksek yüzey enerjisi ve daha hidrofilik yüzeyi sayesinde, daha fazla sayıda hücrenin proliferasyonu için uygun ortam oluşturmaktadır (Yi ve ark 2004).

Bütün bu olumlu niteliklerine ek olarak, elde edilen ürün kollagen matriks rekonstrüksiyonunu hızlandırmakta ve kollagen matriksin farklı solventlerdeki çözünürlüğünü azaltmaktadır (Takahashi ve ark 1996). Buna ek olarak kollagen matriksin fiziksel özelliklerini geliştirmekte, elastikiyetini, denatürasyon sıcaklığını ve materyal yüzeyine fibroblast göçünü arttırmaktadır. Yumurta kabuk zarı proteini doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek olan umut vaadeden bir ürün olarak dikkat çekmektedir (Jia ve ark 2008, Lu ve ark 2009, Jia ve ark 2012).

Günümüzde dental implantoloji diş hekimliğinde önemli bir konuma sahip olan ve birçok araştırmacının üzerinde çalıştığı bir konudur. Yapılan çalışmalar ise özellikle kemik kalitesinin ve miktarının yetersiz olduğu klinik durumlarda, implantların klinik başarısını arttırmayı ve iyileşme dönemini kısaltmayı amaçlamaktadır. İmplant yüzeyinin kompozisyonu, topografik özellikleri, pürüzlülüğü implantın yüzey enerjisi

üzerinde belirleyici rol üstlenmektedir. Yüzey enerjisindeki değişiklikler de implant-kemik bağlantısı üzerinde etkili olmaktadır (Smith ve ark 1991, Kieswetter ve ark 1996).

İmplant yüzeyinin pürüzlülüğü arttırmak amacıyla, yüzeyden materyal kaldırarak pürüzlendirmeyi mümkün kılan kumlama, asitle pürüzlendirme ve anodizasyon tekniklerine ek olarak, yüzeye eklenti yaparak işlem gören plazma sprey, lazer ablazyon ve biyomimetik kaplama teknikleri ve benzerleri geliştirilmiştir (Parekh ve ark 2012).

Biyomimetik kaplama teknikleri vasıtasıyla, titanyum implant yüzeylerine ve çeşitli polimer yüzeylere kalsiyum fosfat kristalleri kaplanabilmektedir. Kaplamayla oluşturulan bu kristallerin büyük bir kısmı in vivo ortamda osteokondüktif özellik göstermektedir. Ayrıca biyomimetik kaplama işlemi fizyolojik sıcaklık ve pH değer aralığında yapılabildiğinden, kalsiyum fosfat kristallerine çeşitli osteoindüktif özellik taşıyan materyaller de eklenebilmektedir (Leonor ve ark 2005, Liu ve Hunziker 2009).

Yumurta kabuk zarı ise kemik dokusu organik matriksinin de temelini oluşturan tip I ve tip V kollagen içermektedir. Ancak kabuk zarının biyomühendislikteki uygulama alanları sınırlıdır (Wong ve ark 1984, Alberts B ve ark 2002, Yi ve ark 2004). Yumurta kabuk zarı proteini ise, yumurta kabuk zarından elde edilmekte ve fiziksel özellikleri üzerinde değişiklik yapılabilmektedir (Takahashi ve ark 1996). Bu yönüyle değerlendirildiğinde yumurta kabuk zarına göre daha geniş bir kullanım alanına sahiptir ve doku mühendisliğinde daha yaygın olarak kullanılabilecek bir materyaldir (Lu ve ark 2009).

Bu çalışmada, biyomimetik yaklaşımla kalsiyum fosfat kristalleri kaplanmasını takiben devekuşu yumurtası kabuk zarı proteini adzorbe edilen grade 5 Ti vidalarla, işlem görmeyen grade 5 Ti vidaların biyouyumluluğu, elde edilen yüzeyin biyoaktivitesi, kaplamanın osseointegrasyon düzeyi üzerindeki etkileri histolojik, histomorfometrik ve mikrotomografik yöntemlerle postoperatif dönemin altıncı haftasında incelenmiştir.

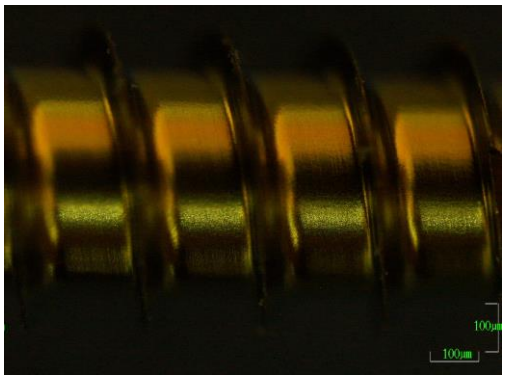
2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Grade 5 Ti Vidaların Kaplama Öncesi Yüzey Aktifleştirme İşlemleri

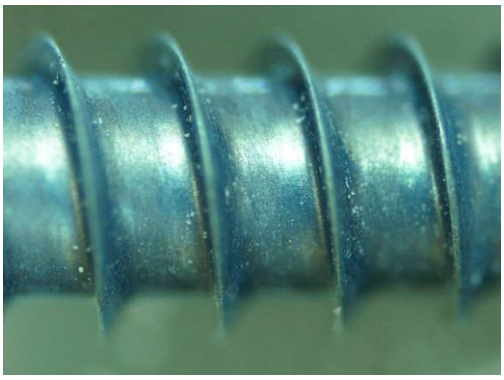
Bu çalışma için Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulundan (2014-002) hayvan etiği açısından onay (Bkz. EK-A) alınmıştır.

Ti vidaların kaplama öncesi yüzey aktifleştirme ve yapay beden sıvısı içerisindeki kaplama yüzeyi oluşturma işlemleri Tas ve Bhaduri (2004)' nin tarif ettiği prosedür doğrultusunda yapıldı.

İşlem boyunca Ti vidalarla (Şekil 2.1) birlikte beş adet grade 5 Ti miniplak da işlendi. İlk önce mekanik olarak 1200 gritlik silikon karbit (SiC) zımpara kağıdı ile zımparalandı. Daha sonra vidalar sırasıyla asetonda yıkandı (15 dk) ve takiben etanolde (15 dk) ve deiyonize suda durulandı. Durulama sonrasında kurutulan vidalar 60^0C derecede 24 saat süreyle kapalı cam beherde 150 mL' lik 5 mol potasyum hidroksit (KOH) solüsyonunda muamele edildi. Daha sonra ise distile suda durulanan Ti vidalar alüminyum folyolara sarılarak, sıcaklığı kademeli biçimde arttırılıp azaltılan 600^0C derecedeki fırında 1 saat boyunca bekletildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. İşlem görmemiş vidanın görünümü.



Şekil 2.2. Yüzey aktivasyonundan sonra vidanın görünümü.

2.2. Yapay Beden Sıvısının (SBF 10X) Hazırlanması

3,5 litre kapasiteli cam behere 1900 mL hacminde deiyonize su eklendikten sonra sırasıyla çizelge 2.1' de belirtilen miktarda ve karşılık gelen konsantrasyonlarda

sodyum klorür (NaCI), potasyum klorür (KCI), kalsiyum klorür dihidrat ($CaCI_2.2H_2O$), magnezyum klorür hegzahidrat ($MgCI_2.6H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) eklendi. Ekleme işlemi oda sıcaklığında ve her reaktif deiyonize suda tamamıyla çözdürüldükten sonra sırasıyla eklenerek yapıldı. Her bir reaktifin suda çözdürülmesini takiben toplam sıvı hacmi 2 litreye tamamlandı ve pH' sı 4,35-4,40 olarak ölçülen solüsyon stabil halde oda sıcaklığında saklanabilecek hale geldi.

Çizelge 2.1. YBS 10X' e ait reaktif miktarları ve bunların iyon konsantrasyonları.

Reaktif	**Eklenme Sırası**	**Miktar (gr)**	**Konsantrasyon (mM)**
NaCI	1	116.8860	1000
KCI	2	0.7456	5
$CaCI_2.2H_2O$	3	7.3548	25
$MgCI_2.6H_2O$	4	2.0330	5
NaH_2PO_4	5	2.3996	10

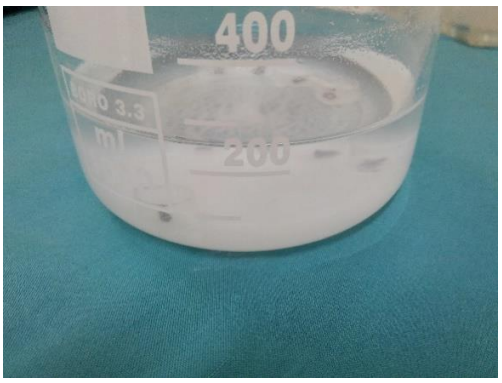
Grade 5 Ti vida ve miniplakların kaplanması için, yukarıda anlatılan yöntemle hazırlanan kaplama solüsyondan alınan 270 mL kaplama solüsyonu, başka bir cam behere aktarıldıktan sonra, solüsyon içerisindeki hidrojen karbonat iyonu (HCO_3^-) düzeyini 10 mM' ye çıkarmak amacıyla solüsyona yeteri kadar sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) eklendi. Bu ekleme işlemi sonrasında solüsyon pH' sının 6,5' e yükseldiği teyit edildi (Şekil 2.3). Ti vida ve miniplakların kaplanması için gereken uygun iyon konsantrasyonuna (1137,5 mM) ulaşılmış olduğu literatür bilgiye dayanarak kabul edildi. Daha önceden yüzey aktivasyonu işlemi görmüş olan Ti vidalar ve miniplaklar behere yerleştirildi ve beherin ağzı kapatılarak, oda sıcaklığında (21 ile 23^0C arasında) 6 saat beklendi. Vidaları ve miniplakları içeren solüsyon süre boyunca dakikada 75 kez titreşecek şekilde çalkalandı (Şekil 2.4). Her iki saatte bir berraklaşan ve kap tabanında çökelti oluştuğu görülen 270 mL'lik kaplama solüsyonu yenilendi (Şekil 2.5 ve 2.6). Uygulanan bu işlemlerin sonunda Ti vida yüzeylerinde (Şekil 2.7) ve düz yüzeye sahip miniplak (Şekil 2.8) yüzeylerinde kalsiyum fosfat kaplama yüzeyi elde edildi.



Şekil 2.3. Hazırlanan solüsyonun sıcaklık ve pH değerleri.



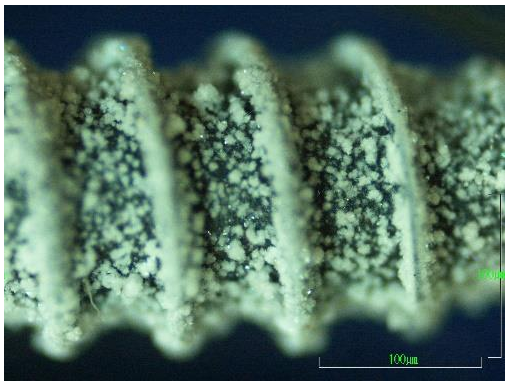
Şekil 2.4. Titanyum alaşım vidaları içeren YBS 10X solüsyonuyla gerçekleştirilen, kaplama işlemi.



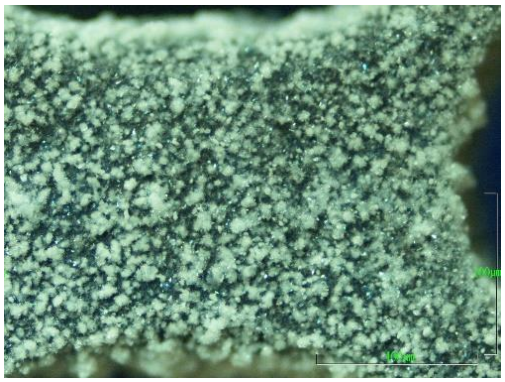
Şekil 2.5. Her bir kaplama seansında yaklaşık 270 cc kaplama solüsyonu kullanıldı.



Şekil 2.6. Her iki saatin sonunda solüsyonun berraklaştığı ve tabanda çökelti oluştuğu görüldü.



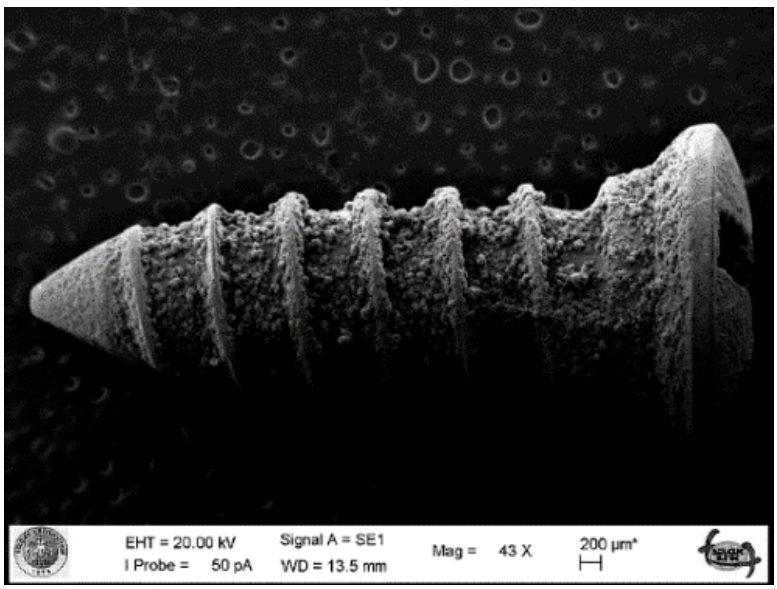
Şekil 2.7. Altı saatlik kaplama işlemi uygulanan vida yüzeyinin görünümü.



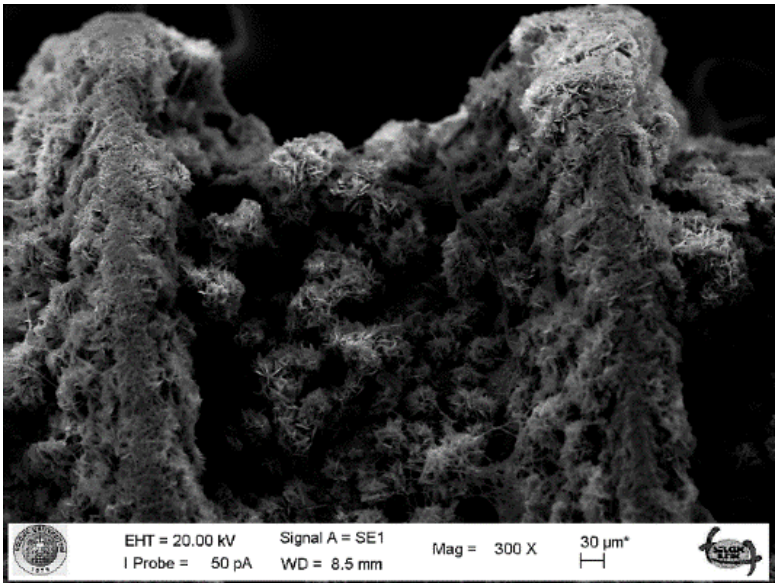
Şekil 2.8. Altı saatlik kaplama işlemi uygulanan miniplak yüzeyinin görünümü.

2.3. Kaplama Yüzeyinin Özelliklerinin Belirlenmesi

Kaplama işlemi tamamlanan Ti vida ve miniplaklar, yeterli sürede deiyonize su ve etanol ile durulandıktan sonra havada kurutuldu. SEM (Zeiss Evo LS10, Carl Zeiss® NTS, Almanya) ile yüzey morfolojisi değerlendirildi ve (Şekil 2.9 ve Şekil 2.10) ve kalsiyum fosfat kaplama kalınlığı belirlendi. Bu amaçla yapılan SEM ve EDX analizleri sekonder elektron modunda 20 kV' lik hızlandırma voltajıyla gerçekleştirildi. EDX analiziyle, kaplamanın kimyasal kompozisyonu belirlendi.



Şekil 2.9. Kalsiyum fosfat kaplanan bir grade 5 Ti vidanın SEM görüntüsü. Büyütme oranı: 43X.



Şekil 2.10. Kalsiyum fosfat kaplanmış vida yüzeyinin SEM görüntüsü. Büyütme oranı: 300X.

Kaplama yüzeyindeki kalsiyum fosfat kristallerinin niteliğini belirlemek amacıyla X-Işınları kırınımı analizinden (Bruker® D8 advance, Kontich, Belçika) yararlanıldı. Numune yüzeyi 1,54060 Å dalga boyunda, tarama hızı 2^0/dakika olacak biçimde, 10^0 ile 50^0 derece arasında tarandı. Elde edilen X-Işını kırınım difraktogramı, Diffrac Eva (Bruker®, Kontich, Belçika) programıyla International Center For Diffraction Data (ICDD) ile değerlendirildi.

2.4. Yumurta Kabuk Zarı Proteinlerinin Elde Edilmesi ve Kalsiyum Fosfat Kaplanan Vida Yüzeyine Yumurta Kabuk Zarı Proteini Adzorpsiyonu

Yumurta kabuk zarı proteini, literatürdeki tarife uygun şekilde elde edildi (Takahashi ve ark 1996, Ino ve ark 2006).

Daha önceden hazırlanan yumurta kabuk zarı tozunun (Şekil 2.11) 3 gramı için, 30 mL hidrojen peroksit (H_2O_2) ve 270 mL formik asit (HCOOH) karışımıyla (v/v) hazırlanan performik asitle 25^0C' de 24 saat muamele edildi ve çözelti cam filtreden süzüldü (Şekil 2.12). Elde edilen süzüntü distile suyla yıkandı ve elde edilen ara ürünün 2 gramlık kısmı, %1' lik (v/v) 0,5 mol asetik solüsyonuyla hazırlanan 3200 İÜ/mg enzimatik aktiviteye sahip olan pepsinden (Sigma-Aldrich), 20 mg ilave edilerek çalkalanmak suretiyle 25^0C' de 48 saat muamele edildi. Süre sonunda 0,2

mg/100 mL konsantrasyonundaki pepstatin (Sigma-Aldrich) ilave edilerek enzimatik aktivite durduruldu. Bu işlemi takiben santrifüje edilen ürünün zar proteinlerinden zengin üstteki kısmı alındı ve diyalize edilip zenginleştirilen çözelti liyofilize edilerek protein fraksiyonu ayrılmak suretiyle toz formundaki yumurta kabuk zarı proteini elde edildi. Hazırlanan ürün kullanılıncaya kadar derin dondurucuda saklandı.



Şekil 2.11. Zar proteini eldesinde kullanılan devekuşu yumurta kabuk zarı tozu görülmektedir.



Şekil 2.12. Hazırlanan çözeltinin cam filtreden süzülmesi görülmektedir.

Yumurta kabuk zarı proteini adzorpsiyonu Narbat M ve ark (2006)' nın metoduna göre gerçekleştirildi.

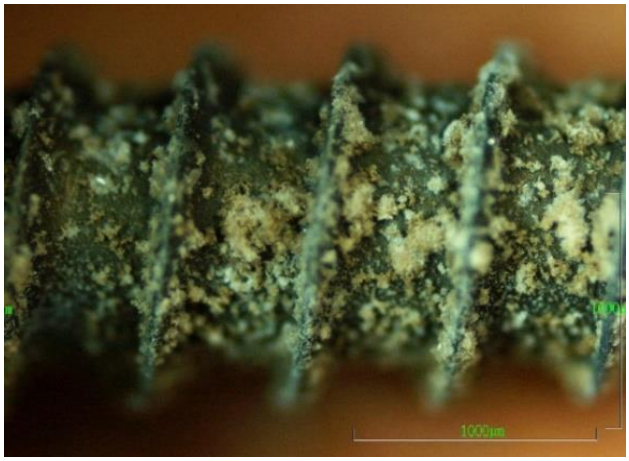
Bu amaçla;

Elde edilen yumurta kabuk zarı proteini %2' lik asetik asitte 50 µg/ ml (w/v) konsantrasyonunda olacak şekilde çözdürüldü. Hazırlanan solüsyonun pH' sı 0,1M sodyum bikarbonatla 7,5' e ayarlandı. Hacim artışından kaynaklanabilecek sapmaları önlemek amacıyla hesaplamalar dikkatle yapıldı (Şekil 2.13.).



Şekil 2.13. Asetik asit (%2) solüsyonunda çözdürülen ve pH' sı 7,4' e ayarlanan yumurta kabuk zarı proteini çözeltisi.

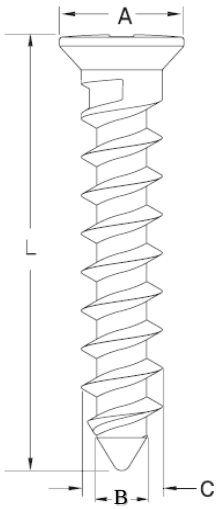
Daha önceden kalsiyum fosfat kaplanan Ti vidalar bu çözeltiye atıldı ve 400 mbar vakum altında, 40^0C' de 4 saat bekletildi. Süre sonunda vidalar porselen potalar içinde 30^0C'de kurutuldu ve %8' lik (v/v) glutaraldehit solüsyonuda 3 saat bekletilerek zar proteinlerinin kalsiyum fosfat yüzeyine çapraz bağlarla tutunması sağlandı. Takiben %3' lük sodyum bisülfitle yıkanarak bu solüsyondan çıkarılan vidalar, distile suyu 6 saatte bir kez değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle distile suda çalkalandı ve 40^0C' de kurutuldu (Şekil 2.14). Etilen oksitle sterilize edilen vidalar kullanıncaya kadar buzdolabında saklandı.



Şekil 2.14. Kalsiyum fosfat kaplanan ve yumurta kabuk zarı proteini adzorbe edilen grade 5 Ti vida yüzeyi görülmektedir.

2.5. Deney Hayvanları

Yapılan deneysel çalışmada erişkin ve ağırlıkları 3,2-3,9 kg arasında değişen 5 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Hayvanlar çalışmada kullanılmadan önce veteriner hekim tarafından kontrol edildi ve genel sağlık durumlarının normal olduğu onaylandı. Çalışmada deney ve kontrol gruplarında 1,95 mm çapında 6 mm uzunluğunda Le Forte® marka (20-MN-006) grade 5 Ti alaşım vidalar kullanıldı (Şekil 2.15) (Çizelge 2.2).



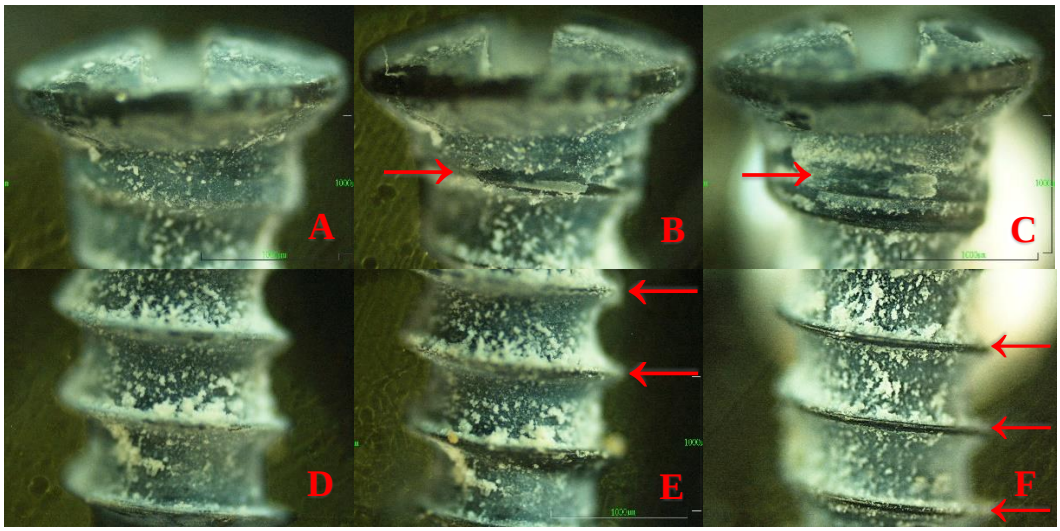
Şekil 2.15. Çalışmada kullanılan bir vidanın teknik çizimi. A: Vidanın kafa çapı, B: Vidanın iç çapı, C: Vidanın dış çapı, L: Vida Boyu.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan grade 5 Ti vidanın boyutları.

Kullanılan grade 5 Ti Vida Boyutları (mm)

Dış Çapı (C)	İç Çapı (B)	Boyu (L)	Kafa Çapı (A)
1,95 mm	1,2 mm	6 mm	3 mm

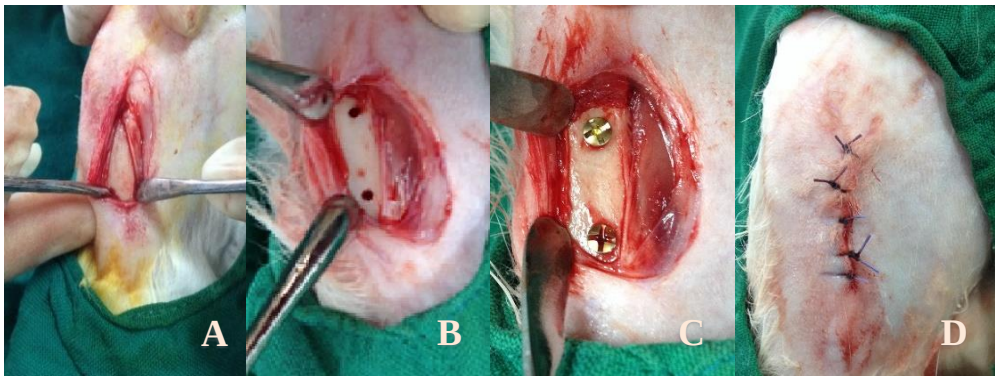
Deney aşamasında vidalar tavşan tibialarına yerleştirilmeden önce, vidalama esnasında yüzeyden kaplama malzemesinin ayrılma durumu in vitro tavşan tibia modelinde ışık mikroskobuyla incelendi (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Kemiğe yerleştirilmemiş vida yüzeyleri (A ve D). In vitro ortamda tavşan tibiasında oluşturulan 1,9 mm'lik kaviteye yerleştirilen vida yüzeyi (B ve E) görülmektedir. Oklar kaplama malzemesinin yüzeyden ayrıldığı bölgeleri göstermektedir. Benzer biçimde 1,8 mm'lik kaviteye yerleştirilen vida yüzeyi ve yüzeyden kaplama malzemesi ayrılma bölgeleri (C ve F) görülmektedir.

2.6. Cerrahi İşlemler

Tavşanlar, ketamine hidroklorür (35 mg/kg, Ketanes, Alke, İstanbul, Türkiye) ve ksilazin (5 mg/kg, Rompun, Bayer, Leverkusen, Almanya) kombinasyonunun intramuskuler yolla enjeksiyonuyla genel anesteziye alındı. Defekt sahası uygun şekilde tıraş edilerek povidon iyotla silindi. Daha sonra tibia medialindeki deri ve periost 15 nolu bistüri ile kesilerek kemik yüzeyi açığa çıkartıldı (Şekil 2.17A). Sağ ve sol tibialarda anteromedial bölgede kortikal kemiğe 2' şer adet olmak üzere her bir hayvanda dörder adet 2,0 mm çapında 6 mm uzunluğunda vidaların yerleştirileceği defektler oluşturuldu (Şekil 2.17B). Defekt sahaları serum fizyolojikle yıkanıp kanama kontrolü sağlandıktan sonra her hayvanın bir tibiasından birine 2 adet kalsiyum fosfat kaplanan ve yumurta kabuk zarı proteini adzorbe edilen grade 5 Ti vida ve diğerine de herhangi bir işlem görmemiş olan 2 adet grade 5 Ti vida yerleştirildi (Şekil 2.17C). Bu işlem 1,2 mm işaretleyici rond frez, 1,5 mm ve 1,8 mm çaplı frezlerle torklu tornavidadan oluşan set yardımıyla gerçekleştirildi. Vidaların yerleştirilmesi sırasında maksimum 2,5 Ncm tork uygulandı. Kesi bölgesi vicryl 4-0 süturla, periost ve cilt ayrı ayrı olmak üzere primer kapatıldı (Şekil 2.17D).



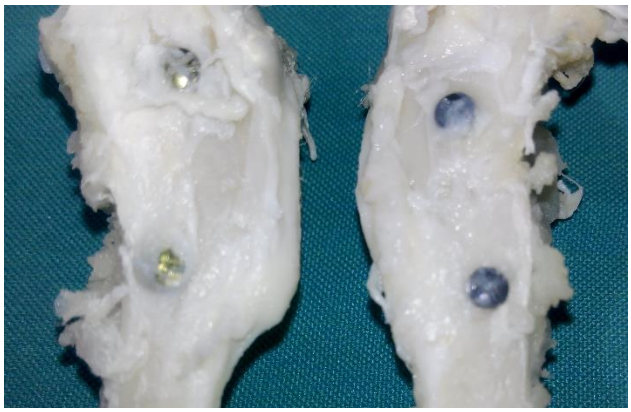
Şekil 2.17. Tavşan modeli üzerinde yapılan cerrahi işlem basamakları görülmektedir.
A: Cerrahi disipline uygun olarak hazırlanan tibia bölgesinden, cilt ve cilt altı dokular geçilerek kemiğe ulaşılması.
B: Tibianın anteromedial bölgesinde işaretlenen vida yuvaları.
C: Kemiğe yerleştirilen Ti vidalar.
D: Cerrahi kesi hattının 4-0 vikril sütur materyaliyle önce periost ve takiben de deri olmak üzere sırasıyla primer kapatılmış hali.

Operasyonlar sırasında hayvanların vücut sıcaklığı korundu. Hayvanlara postoperatif dönemin ilk 5 günü boyunca Iecilline 40,000 İU ve analjezik olarak da 1 mg/kg tramadol intramuskuler yolla verildi.

Hayvanlar, operasyonu takiben standart tavşan yemi ve suyla ad libitum beslendi ve her gün klinik takipleri yapıldı. Operasyon sonrası altıncı haftada, hayvanlar önce tartıldı ve sonra intraperitoneal yolla aşırı dozda (100 mg/kg) pentobarbital (Nembutal, 100 mg/mL, Abbott Laboratories, Chicago, IL) verilerek sakrifiye edildi. Ti vidaları içeren tibia örnekleri alınarak % 10' luk tamponlu formal-salin (0,1M, pH 7,4) solüsyonuna alındı.

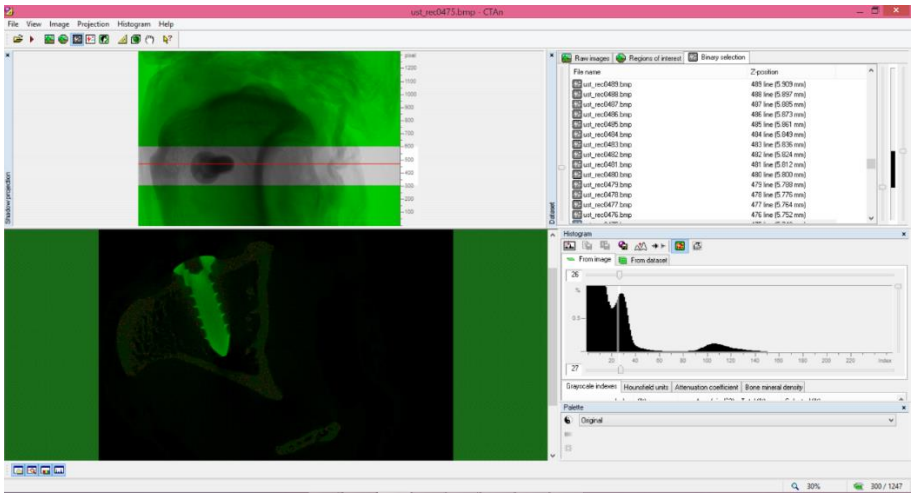
2.7. Mikrotomografik Değerlendirme

Çalışmada kullanılan vidaların, mikrotomografik incelemeleri 6. hafta sonunda yapıldı. Kaplama grubu ile kontrol grubu arasındaki kemik hacmi/toplam hacim (Kh/Th), kemik yüzey yoğunluğu (Ky/Th), trabekül sayısı, trabeküler boşluk, trabeküler kalınlık ve kemik mineral yoğunluğu (KMY) değerleri ölçülerek, elde edilen sayısal veriler Mann Whitney U testiyle analiz edilmiştir. Mikrotomografik inceleme esnasında Ti vidaları içeren tibia örnekleri (Şekil 2.18), serum fizyolojikle nemlendirilen kağıt havluya sarılarak kurumaları engellendi.

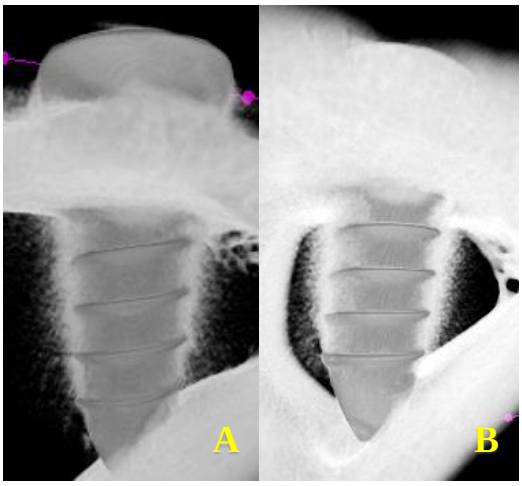


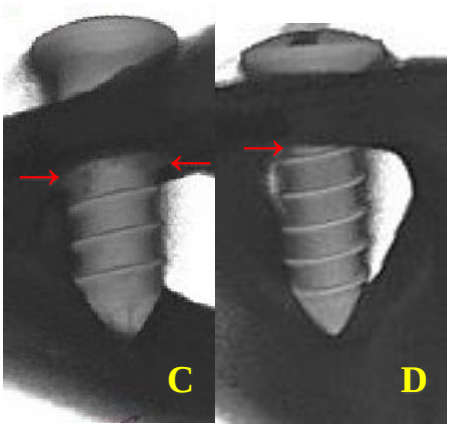
Şekil 2.18. Kontrol ve deney grubuna ait grade 5 Ti vidaları içeren tibia örnekleri.

Mikrotomografik inceleme, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Mükemmeliyet Merkezine ait SkyScan-1172 (SkyScan® S/N=11M01180, Aartselaar, Belçika) cihazında, Versiyon 1,5 paket yazılımı kullanılarak, 12 µm piksel boyutunda, 100 µA akım ve 100 kV voltaj altında yapıldı. Her bir vidaya çevresinden 360^0 rotasyon yaptırılarak, her birisi 2000×2000 piksel değerinde kesit görüntüleri alındı. Çalışma alanı olarak vida yüzeyinden başlayarak her yöne doğru 1 mm uzanan bölgedeki trabeküler kemik doku sahası belirlendi ve medullar bölgede oluşan yeni kemik dokusu gözlendi. Elde edilen veriler yüksek çözünürlüklü Hamamatsu C9300 11Mp (SkyScan®, Kontich, Belçika) kamerayla kaydedildi. Kaydedilen veriler SkyScan CT Analyser (Bruker®, Kontich, Belçika) volümetrik analiz programı yazılımıyla incelendi (Şekil 2.19). Her iki gruba ait 6' şar adet vidanın çevresindeki dokuya ait; trabekül sayısı, trabeküler boşluk, trabekül kalınlığı, kemik hacmi yoğunluğu (Kh/Th), kemik yüzey yoğunluğu (Ky/Th) ve kemik mineral yoğunluğu (KMY) değerleri hesaplandı. Vidaların medullar bölgeye ait görüntüleri (Şekil 2.20) alındı.



Şekil 2.19. Elde edilen örneklerin, yüzey analiz programı ile incelenmesi sırasında kaydedilen ekran görüntüsü.





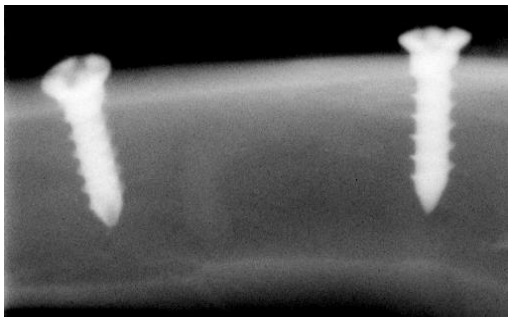
Şekil 2.20. Tibiaya monokortikal olarak yerleştirilen deney (A ve C) ve kontrol grubu (B ve D) titanyum vidaların mikrotomografik görüntüleri ve kırmızı okla işaretlenen yeni kemik oluşum bölgeleri.

2.8. Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme

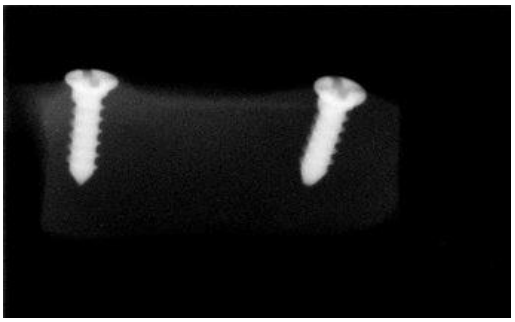
Çalışmaya dahil edilen hayvanlara ait vidaların, histolojik incelemeleri 6. hafta sonunda yapılmıştır. Tamponlu formal-salindeki (Şekil 2.21) doku örnekleri, %10'luk etilen-diamin-tetra-asetik asit (EDTA) içinde, $+4^0$C'de, 3 ay süreyle dekalsifiye edildi (Şekil 2.22).

Dekalsifikasyon tamamlandıktan sonra bir gece akarsuda yıkanan tibia örnekleri daha sonra otomatik doku takip cihazına aktarılarak sırasıyla 80^0, 90^0, 96^0 ve 100' lük alkollerde birer saat, üç farklı ksilolün her birinde yarımşar saat ve ksilol-parafinde yarım saat tutulup, takiben sert parafinde (E.n. 56-58^0C) bloklandı. Hazırlanan bloklardan mikrotomla (SM 2000R, Leica microsystems, Heildelberg, Almanya), poly-L-lizin kaplı lamlara 6 µm'lik kesitler alındı. Kesit alınması esnasında gerek bloklar gerekse mikrotom bıçağı, % 30-40' lik etanol ile sürekli olarak nemli tutuldu ve kesitler, 37^0C' de gece boyunca kurutuldu. Doku kesitleri, ksilen serisinde deparafizisyonu takiben, konsantrasyonları azalan etil alkol serisinden geçirilerek rehidre edildi ve deiyonize distile suya alındı ve hematoksilen-eozin (Culling ve ark 1985, Bradbury ve Gordon 1990), toluidin mavisi (Sakai 1973), crossmon üçlü boyası ve Paapenheim' in panoptik boyasıyla (Tverdynin ve ark 1980) boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobuyla (Nikon Eclipse E 400, Nikon Corporation, Chiyoda-ku, Japan) incelendi ve dijital kamerayla (DS Camera Head DS-5M, DS Camera control unit DS-L1) gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri kaydedilerek, bu görüntüler üzerinde histolojik ve histomorfometrik analiz yapıldı.

Histomorfometrik ölçümlerde elde edilen sayısal veriler SPSS (Ver 15) istatistik programıyla değerlendirildi. Veriler Mann-Whitney U testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi.



Şekil 2.21. Vida yerleştirilen tibianın dekalsifikasyon öncesinde alınan radyografik görüntüsü.



Şekil 2.22. Vida yerleştirilen tibianın dekalsifikasyon sonrasında alınan radyografik görüntüsü.

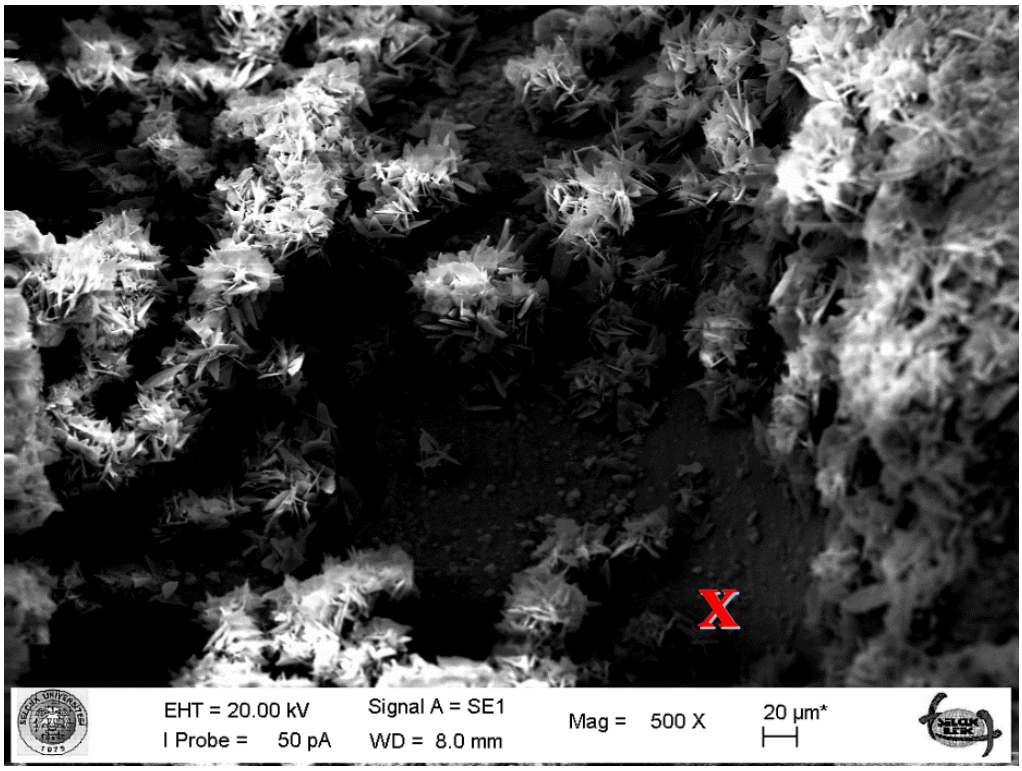
Deney ve kontrol grubundan 6 haftalık dönemde vida-kemik yüzeyindeki enkapsülasyon, yabancı cisim reaksiyonu, kemik modeling ve remodeling ile yeni oluşan kemik sahaları belirlendi.

Kaplama grubu ile kontrol grubu arasındaki, vida çevresinde oluşan yeni kemik dokusu, osteoid doku, bağ dokusu ve kan damarı alanları ölçülerek elde edilen değerler kullanılarak, her iki grup için ortalama alan yüzdeleri hesaplandı.

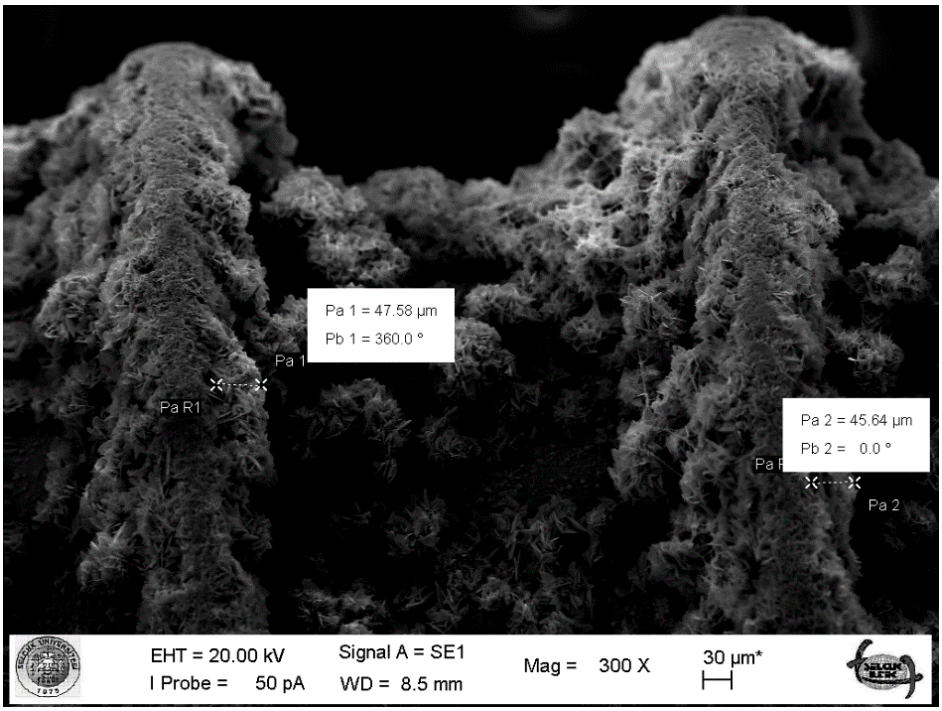
3. BULGULAR

3.1. Kalsiyum Fosfat Kaplama Yüzeyine ait Tarama Elektron Mikroskobu ve EDX Analizi Bulguları

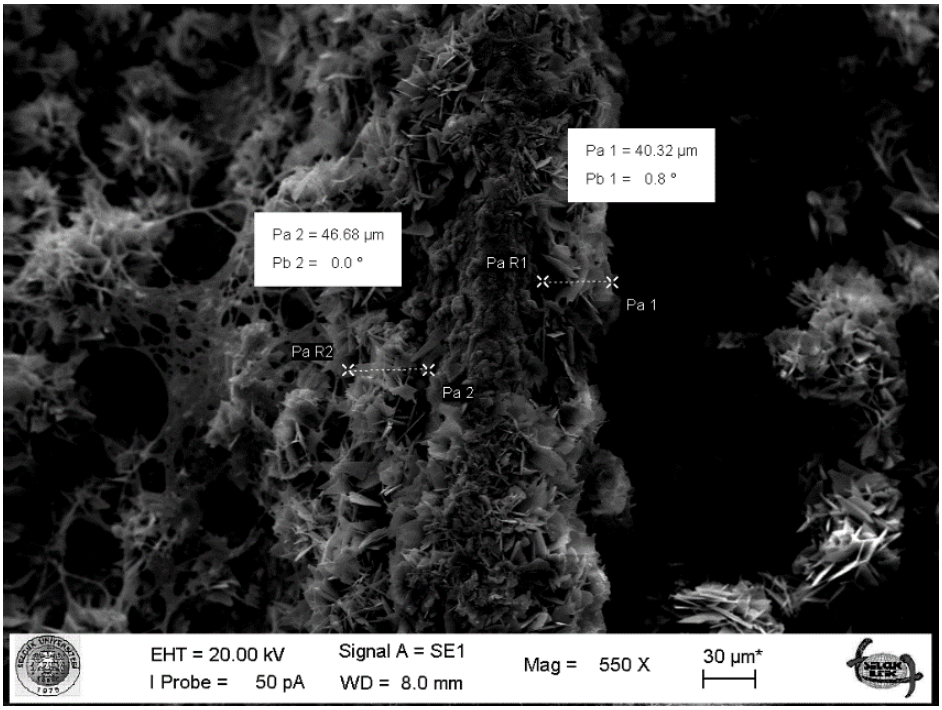
Biyomimetik kaplama yöntemiyle, her 2 saatte bir yenilenen, YBS 10X ile 6 saatte kaplanan vidalarda homojen olmayan kaplama yüzeyi elde edildi (Şekil 3.1), vidaya yivleri (Şekil 3.2-3) ve yivler arası bölgelerde (Şekil 3.4) yapılan ölçümlerde kaplama kalınlığının yaklaşık 32-48 mikron arasında değiştiği tespit edildi.



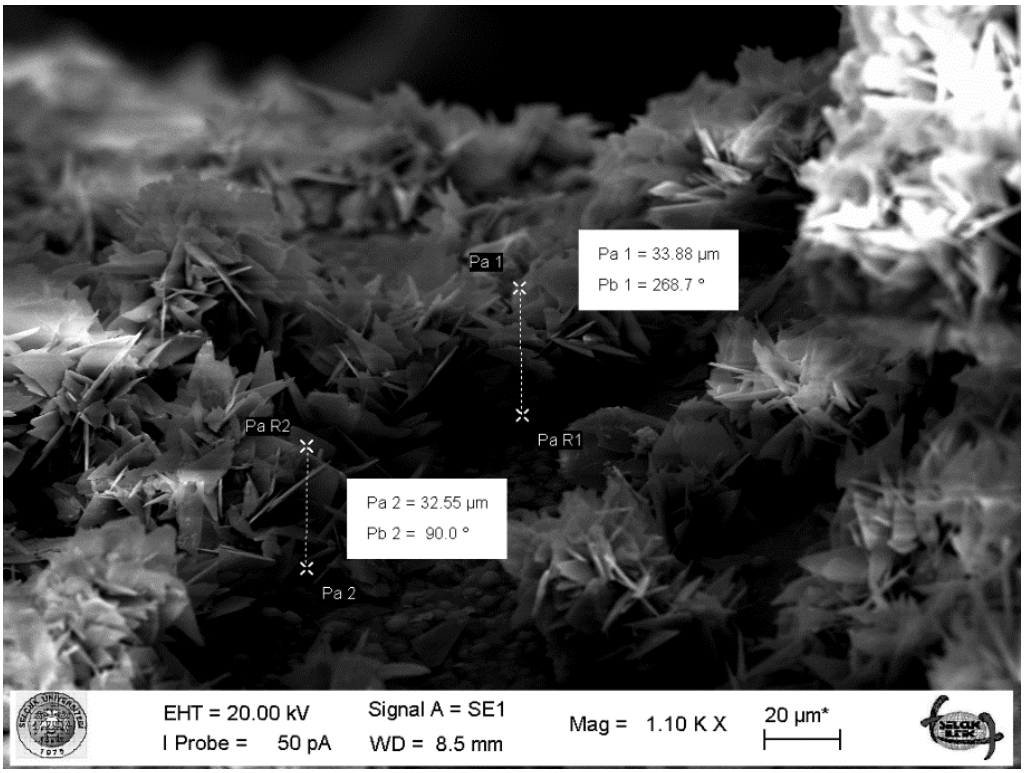
Şekil 3.1. Vida yüzeyinin kaplama işleminden sonraki SEM görüntüsü görüntüsü. Büyütme oranı: 500X. Kristal oluşmayan bölgelerde Ti alaşım yüzey (X) izlenmektedir.



Şekil 3.2. Kaplanan bir vida yüzeyinin SEM görüntüsü. İki farklı bölgedeki kaplama kalınlığı gösterilmiştir. Büyütme oranı: 300X.

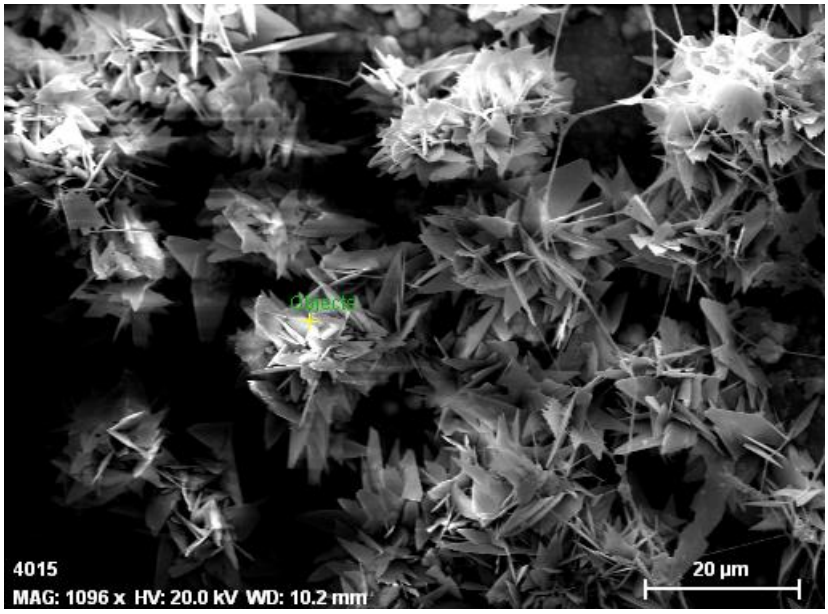


Şekil 3.3. Kaplanan bir vida yüzeyinin SEM görüntüsü. İki farklı bölgedeki kaplama kalınlığı gösterilmiştir. Büyütme oranı: 550X.

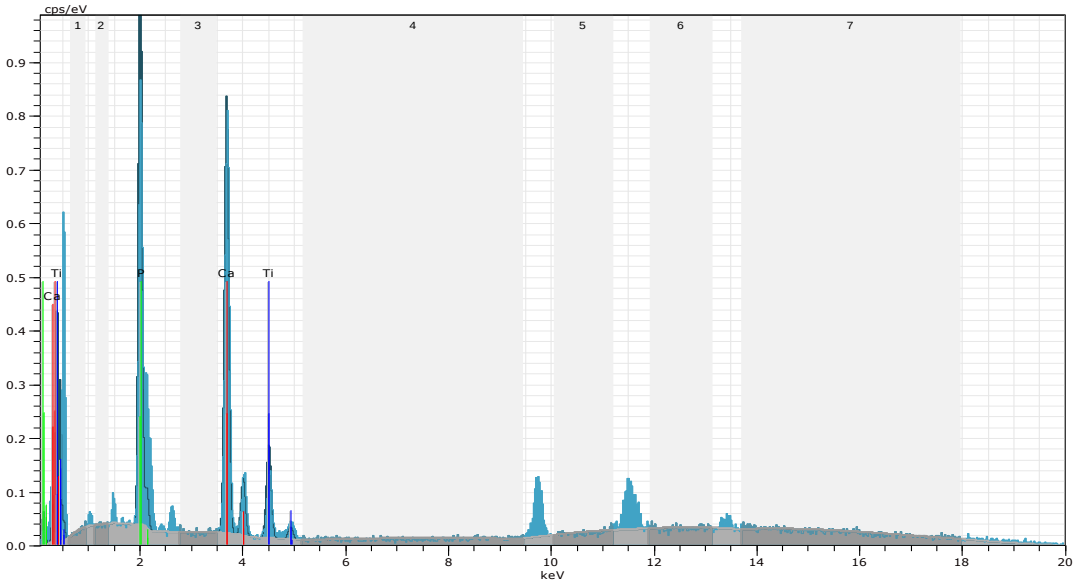


Şekil 3.4. Kaplanan bir vida yüzeyinin SEM görüntüsü. İki farklı bölgedeki kaplama kalınlığı gösterilmiştir. Büyütme oranı: 1100X.

Kaplama yüzeyinin EDX analizinde ise, kaplamayı oluşturan kristal yapıların (Şekil 3.5, Şekil 3.7) kalsiyum/fosfat molar oranının yaklaşık 0,95 ± 0,03 olduğu bulundu (Çizelge 3.1, Şekil 3.6) (Çizelge 3.2, Şekil 3.7).



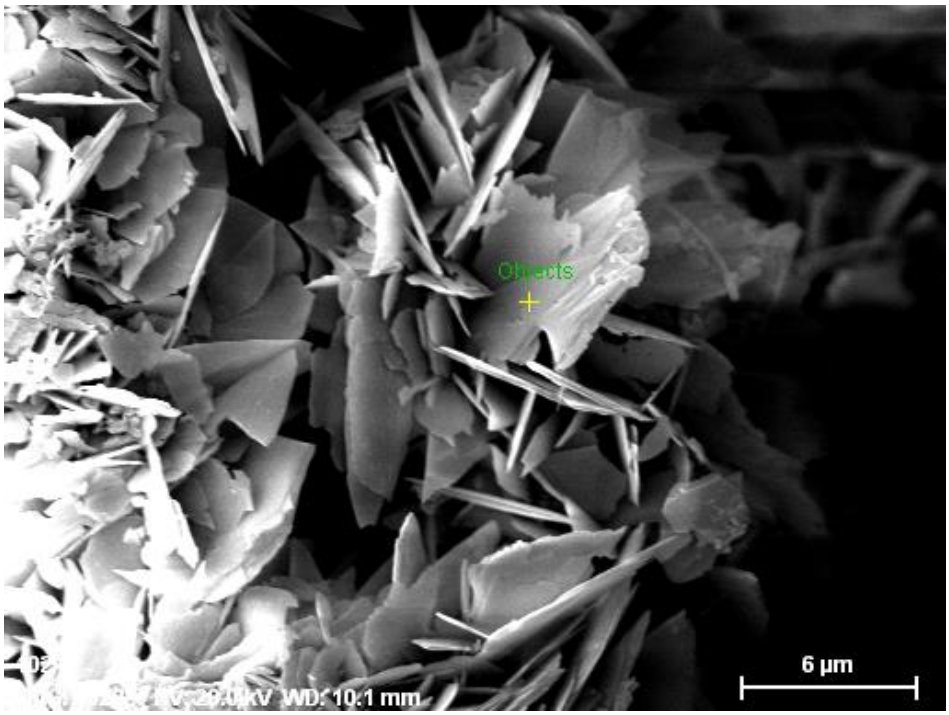
Şekil 3.5. Kalsiyum fosfat oranının belirlenmesi amacıyla, EDX analizi yapılan bir bölge. Büyütme oranı:1096X.



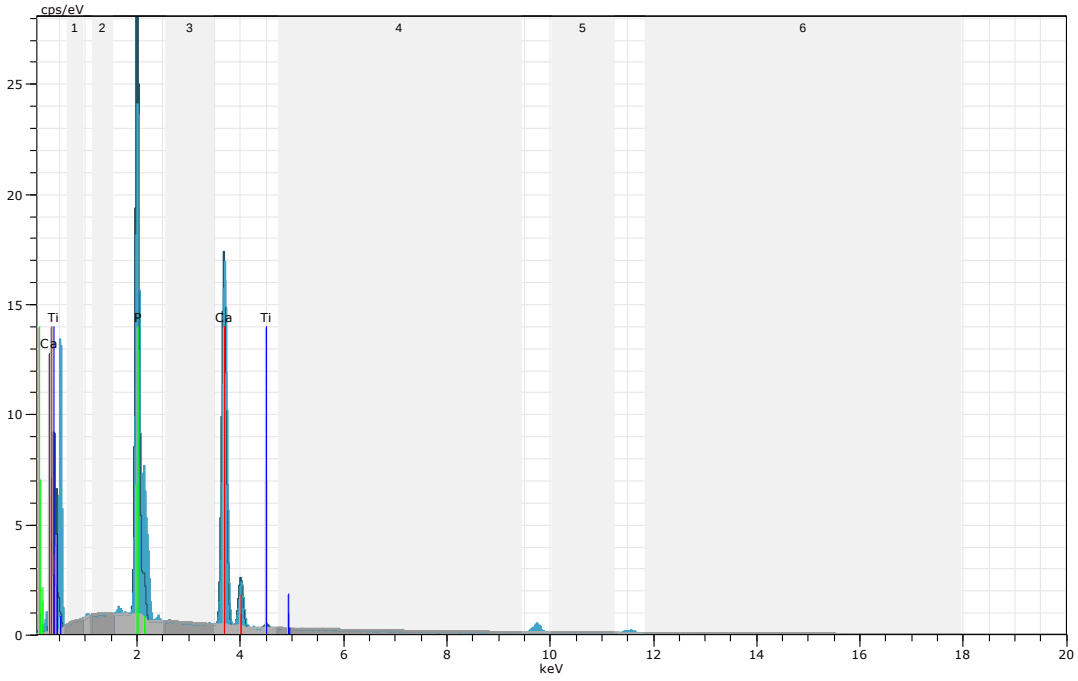
Şekil 3.6. Şekil 3.5' te gösterilen bölgenin element dağılımını gösteren EDX grafiği. Grafikte Ca, P ve Ti elementlerine ait pikler izlenmekte.

Çizelge 3.1. İncelenen bölgedeki kalsiyum fosfor ve titanyum elementleri dağılımı.

Element	Atom ağırlığı esasına göre oranı (%)	Atomların molar dağılımı (%)	Hata Oranı (%)
Kalsiyum	45,22	42,08	0,8
Fosfor	35,89	43,21	0,8
Titanyum	18,89	14,72	0,4
Toplam	100,00	100,00	



Şekil 3.7. Kalsiyum fosfat oranının belirlenmesi için EDX analizi yapılan diğer bir bölge. Büyütme oranı:1096X.



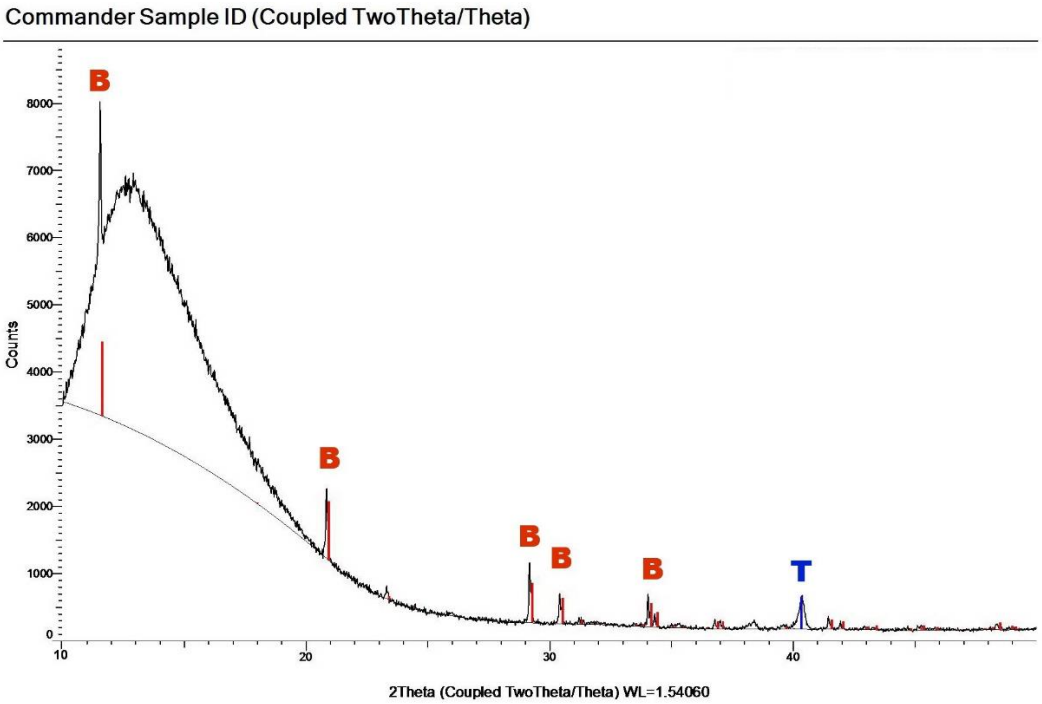
Şekil 3.8. Şekil 3.7' de gösterilen bölgenin element dağılımını gösteren EDX grafiği. Grafikte Ca, P ve Ti elementlerine ait pikler izlenmekte.

Çizelge 3.2. İncelenen bölgedeki ortalama Ca, P ve Ti elementleri dağılımı.

Element	Atom ağırlığı esasına göre oranı (%)	Atomların molar dağılımı (%)	Hata Oranı (%)
Kalsiyum	53,90	47,69	0,8
Fosfor	44,93	51,44	0,9
Titanyum	1,17	0,86	0,1
Toplam	100,00	100,00	

3.2. Kalsiyum Fosfat Kaplama Yüzeyi X-Işını Kırınım Analizi Bulguları

X-Işını kırınım analizi sonucunda elde edilen piklerin, braşit kristallerine ait pik skalasıyla (ICSD kodu: 16132), uyumlu olduğu dikkati çekti. Braşitle uyumlu pikler kırmızı, Ti alaşım ise mavi renkle vurgulandı (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Kalsiyum fosfat kaplama yüzeyine ait X-Işını kırınım analizi sonuçları.

3.3. Mikrotomografi Bulguları

Çalışmada kullanılan hayvanlarda, çalışma sürecinde cerrahi operasyona bağlı komplikasyon gelişmedi. Hayvanlar 6 haftalık deney süresi sonunda sakrifiye edilerek, mikrotomografi ve histolojik inceleme yapıldı.

Mikrotomografi incelemesi bulguları Çizelge 3.3' de özetlenmiştir.

Çizelge 3.3. Grupların mikrotomografi bulguları ve bunların istatistiksel analiz sonuçları.

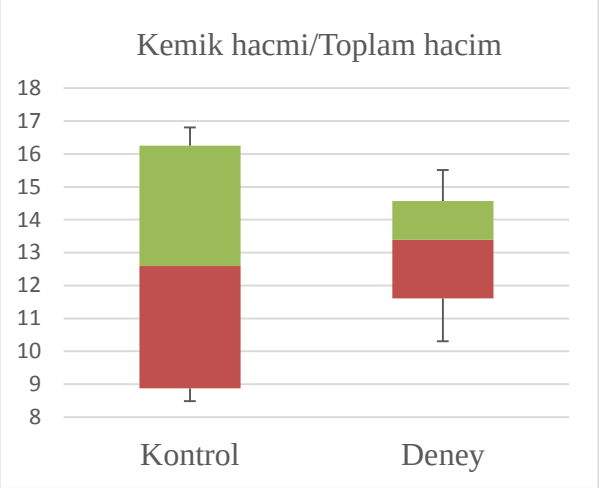
Gruplar N=6	**Kh/Th (%)**	**Ky/Th (mm^{-1})**	**Tra. S. (mm^{-1})**
	X± SS	X± SS	X± SS
Kontrol	12,59± 3,45	2,74± 0,21	0,67± 0,09
Deney	13,15± 1,88	3,57± 0,58	0,86± 0,14
	P>0.05	P<0.05	P<0.05

Çizelge 3.3. (Devamı). Grupların mikrotomografi bulguları ve bunların istatistiksel analiz sonuçları.

Gruplar N=6	**Tra. B. (mm)**	**Tra. K. (mm)**	**KMY ($mgHA/cm^3$)**
	X± SS	X± SS	X± SS
Kontrol	1,26± 0,09	0,18± 0,03	319,47± 11,09
Deney	1,04± 0,18	0,15± 0,02	317,69± 16,32
	P>0.05	P>0.05	P>0.05

3.3.1. Kemik Hacmi/Toplam Hacim

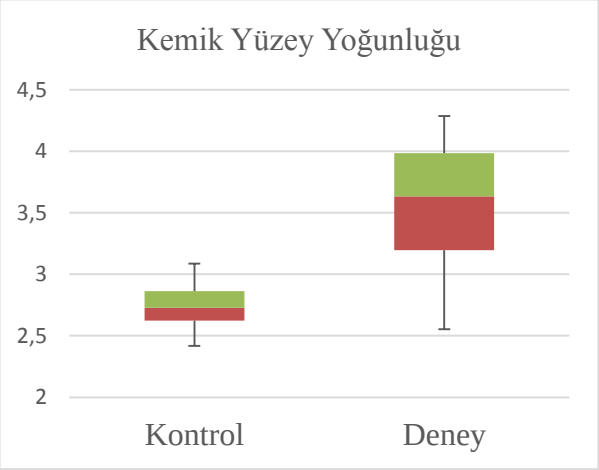
Deney ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, her iki grubun ortalama kemik hacmi/toplam hacim oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 3.10, Çizelge 3.3).



Şekil 3.10. Deney ve kontrol grubunun ortalama kemik oranları (%).

3.3.2. Kemik Yüzey Yoğunluğu

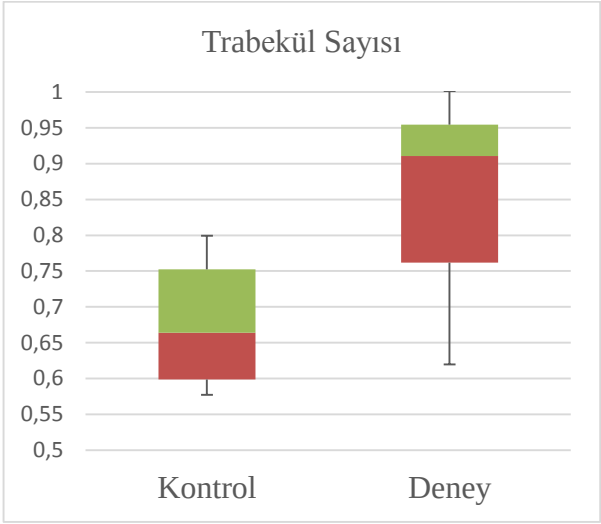
Deney ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, her iki grubun ortalama kemik yüzey yoğunlukları (kemik yüzeyi/toplam hacim) arasında istatistiksel açıdan önemli fark ($p<0,05$) tespit edildi (Şekil 3.11, Çizelge 3.3).



Şekil 3.11. Deney ve kontrol grubunun ortalama kemik yüzey yoğunluğu değerleri (mm^{-1}).

3.3.3. Trabekül Sayısı

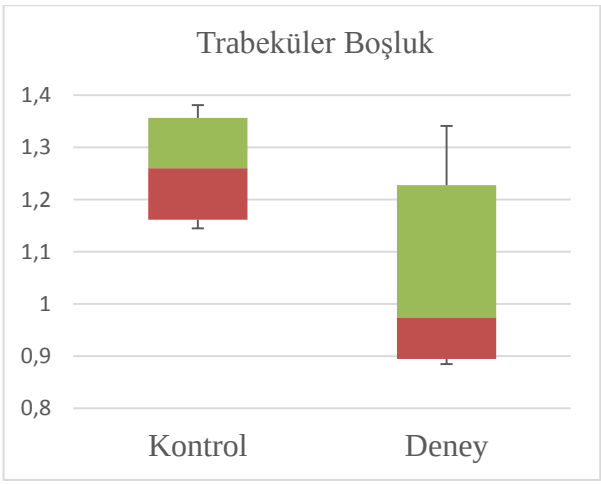
Deney ve kontrol gruplarının ortalama trabekül sayıları arasında istatistiksel açıdan önemli fark ($p<0,05$) tespit edildi (Şekil 3.12, Çizelge 3.3).



Şekil 3.12. Deney ve kontrol grubunun ortalama trabekül sayıları (mm^{-1}).

3.3.4. Trabeküler Boşluk

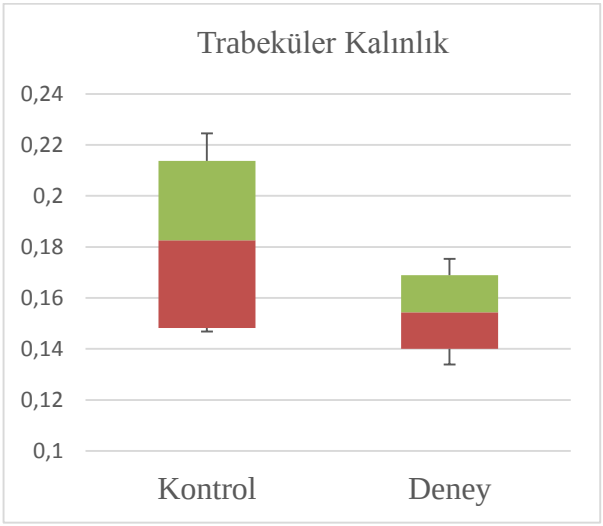
Deney ve kontrol gruplarının ortalama trabeküler boşluk verileri arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 3.13, Çizelge 3.3).



Şekil 3.13. Deney ve kontrol grubunun, ortalama trabeküler boşluk verileri (mm).

3.3.5. Trabeküler Kalınlık

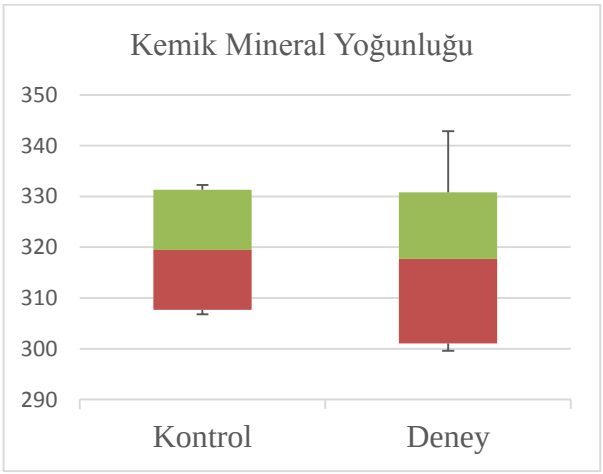
Deney ve kontrol gruplarının trabeküler kalınlıkları arasındaki fark önemsizdi ($p>0,05$) (Şekil 3.14, Çizelge 3.3).



Şekil 3.14. Deney ve kontrol gruplarının, ortalama trabekül kalınlığı oranları (mm).

3.3.6. Kemik Mineral Yoğunluğu

Deney ve kontrol gruplarının ortalama kemik mineral yoğunlukları birbirine yakın olup, aradaki fark istatistiksel öneme sahip değildir ($p>0,05$) (Şekil 3.15, Çizelge 3.3).



Şekil 3.15. Deney ve kontrol gruplarının, ortalama kemik mineral yoğunluğu değerleri (mg/cm^3).

3.4. Histolojik ve Histomorfometrik Bulgular ve Verilerin İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları

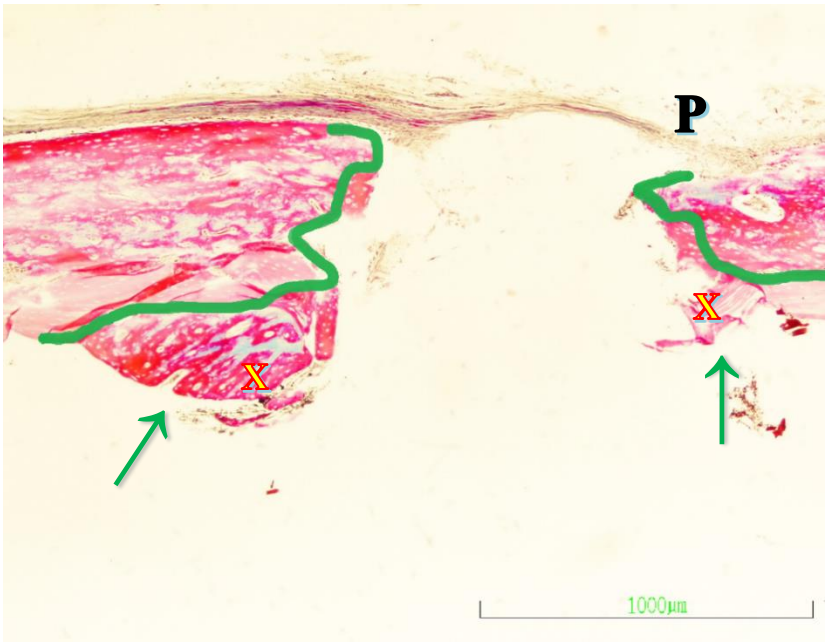
Histomorfometrik inceleme bulguları Çizelge 3.4' de özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Grupların histomorfometrik inceleme bulguları ve bunların istatistiksel analiz sonuçları.

Gruplar N=10	**Yeni Kemik (%)**	**Osteoid Doku (%)**	**Bağ Dokusu (%)**	**Kan Damarı (%)**
	X± SS	X± SS	X± SS	X± SS
Kontrol	56,09± 19,51	28± 15,67	14,98± 10,26	0,92± 0,91
Deney	61,42± 16,89	22,05± 11,41	12,23± 7,75	4,29± 2,47
	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P<0.05

3.4.1. Kontrol Grubu

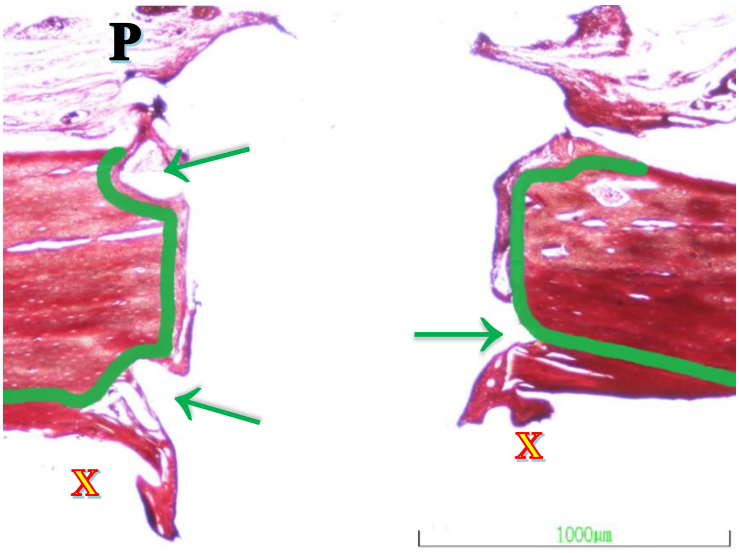
Periost altında vidanın baş kısmı geniş bir yeni yapılan kemik dokusuyla sarılmış durumdaydı. Ayrıca defekt sahasının interkortikal bölgesinde, vida çevresi ince bir bant halindeki yeni yapılan kemik dokusuyla doldurulmuş durumdaydı. Medullar yüzde ise, medullaya doğru uzamış ve vida etrafında yeni oluşan kemik dokusu gözlendi. Vidanın bu bölgedeki yivlerine ve yivler arası bölgeye komşu durumda fibrokartilaj içeren trabeküllere sıklıkla rastlandı (Şekil 3.17). Bu grupta mikroskop sahasında gözlenen ortalama osteoklast sayısı 15 hücre olarak tespit edildi.



Şekil 3.17. Kontrol grubundan bir hayvanın, operasyon sonrası 6. haftada vida yerleştirilen tibia bölgesi kesiti görülmektedir. Defekt sahasının dıştan kopuntusuz bir periosteumla (P) örtülü olduğu, interkortikal bölgedeki vidaya komşu durumdaki kemik yüzeylerinin yeni yapılan primer kemik dokusuyla örtülü olduğu (yeşil bantla işaretli bölge) görülmektedir. Sahanın medullar yüzünde ise vidanın gövde kısmını kaplayan yeni yapılan kemik dokusunun belirgin bir çıkıntı oluşturduğu (oklar) dikkati çekmektedir. Medullar sahadaki yeni yapılan dokunun merkezi kısmında fibrokartilaj dokusu (X) gözlenmektedir. Crossmon'un üçlü boyası. Büyütme çizgisi: 1000 µm.

3.4.2. Deney Grubu

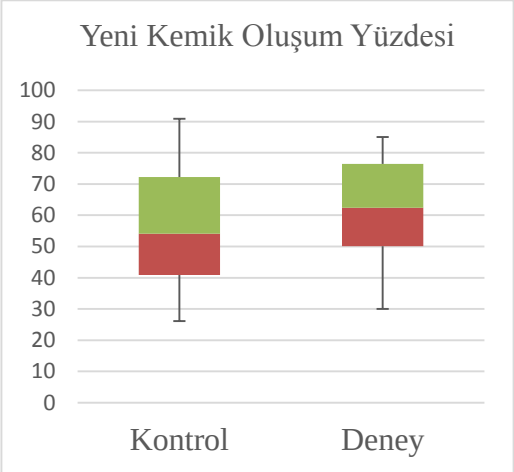
Bu grupta yerleştirilen vidaların boyun kısmı, çoğunluğu yeni oluşan kemik dokusu ve az miktarda da fibrokartilaj dokusuyla sarılmış durumdaydı. Defektin interkortikal bölgesinde vidayla sıkı temastaki, nispeten geniş bir bant halindeki yeni oluşan kemik dokusu gözlendi. Bu gruptaki hayvanlarda, yerleştirilen vidanın medulla içinde uzanan bölümünün interkortikal kemiğe yakın olan kısmı, yeni oluşan lamelli kemik dokusuyla kaplanmış durumdaydı. Yeni oluşan kemik lamellerinin doğrultusu orjinal lamellere dik, vida eksenine paraleldi. Sahada yangısal değişiklikler, enkapsülasyon ve implantın reddine yönelik histolojik değişikliklere rastlanmadı (Şekil 3.18). Bu grupta mikroskop sahasında gözlenen ortalama osteoklast sayısı 25 hücre olarak tespit edildi.



Şekil 3.18. Deney grubundan bir hayvanın, operasyon sonrası 6. haftada vida yerleştirilen tibia bölgesi kesiti görülmektedir. Saha üstten periosteumla (P) örtülü olup, vidanın baş kısmı çevresinde ince bant halinde fibrokartilaj dokusu görülmektedir. İnterkortikal sahada, vidanın yivlerini (oklar) ve yivler arası sahayı lamelli kemik dokusu doldurmuş durumdadır (yeşil bantla işaretli bölge). Kemiğin medullasındaki vida kısmı belirli seviyeye kadar kemik dokusuyla (X) çevrelenmiş durumdadır. Crossmon'un üçlü boyası. Büyütme çizgisi: 1000 µm.

3.4.3. Deney ve Kontrol Gruplarının Yeni Kemik Oluşum Yüzdeleri

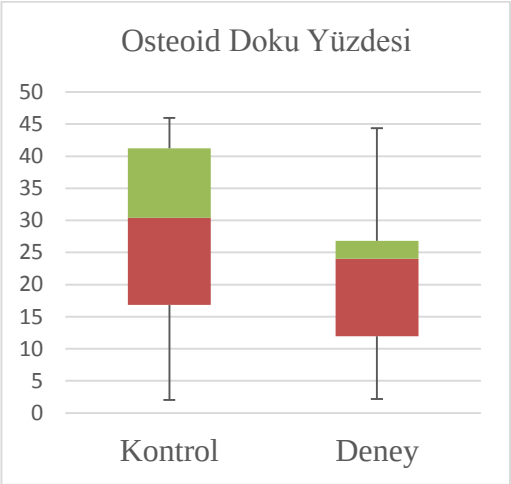
Deney ve kontrol gruplarının ortalama yeni kemik oluşum yüzdeleri arasındaki fark istatistiksel öneme sahip değildir ($p>0,05$) (Şekil 3.19, Çizelge 3.4).



Şekil 3.19. Deney ve kontrol grubunun ortalama yeni kemik oluşum yüzdeleri.

3.4.4. Deney ve Kontrol Gruplarının Osteoid Doku Yüzdeleri

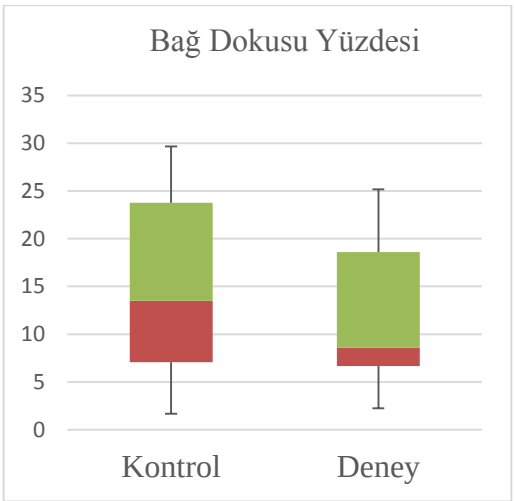
Deney ve kontrol gruplarının ortalama osteoid doku yüzdeleri arasındaki fark istatistiksel öneme sahip değildir ($p>0,05$) (Şekil 3.20, Çizelge 3.4).



Şekil 3.20. Deney ve kontrol grubunun ortalama osteoid doku yüzdeleri.

3.4.5. Deney ve Kontrol Gruplarının Bağ Dokusu Yüzdeleri

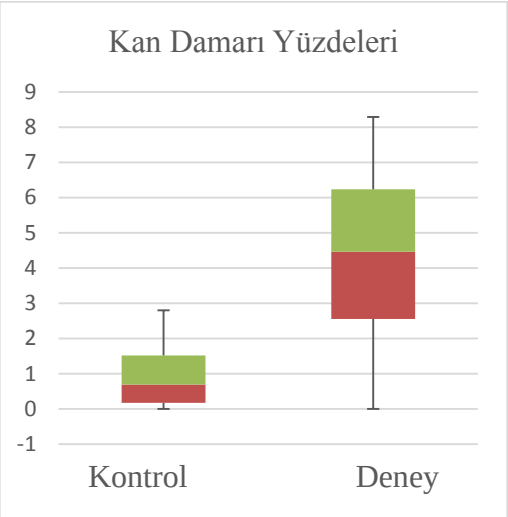
Deney ve kontrol gruplarının ortalama bağ dokusu yüzdeleri birbirine yakın olup, aradaki fark istatistiksel öneme sahip değildir ($p>0,05$) (Şekil 3.21, Çizelge 3.4).



Şekil 3.21. Deney ve kontrol grubunun ortalama bağ dokusu yüzdeleri.

3.4.6. Deney ve Kontrol Gruplarının Kan Damarı Yüzdeleri

Deney ve kontrol gruplarının ortalama kan damarı yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan önemli fark tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 3.22, Çizelge 3.4).



Şekil 3.22. Deney ve kontrol grubunun ortalama kan damarı yüzdeleri.

4. TARTIŞMA

Dental implantlar, diş eksikliklerinin rehabilitasyonunda ve çiğneme fonksiyonunun kazandırılmasında kullanılan, Ti ve diğer metal alaşımlarından üretilen materyallerdir (Misch 1999). Geçmişte diş hekimliğinde özel bir tedavi yaklaşımı olarak kabul gören dental implant tedavisi, zaman ilerledikçe daha fazla talep görmüş ve diğer geleneksel yöntemlerin yerini almaya başlamıştır (Weigl 2003). İmplant destekli protezlerin dişsizliğin giderilmesinde kullanımıyla, çiğneme etkinliğini ve dolayısıyla hasta memnuniyeti artmaktadır (Chee 2005).

Dental implantların uzun bir süre ağızda fonksiyon görebilmesi ve yerleştirilen protezlere destek sağlayabilmesi, dental implant yüzeyi ile canlı kemik dokusu arasındaki bağlantıyla yakından ilişkilidir (Branemark ve ark 1977, Adell ve ark 1981).

Günümüzde yapılan çalışmalarda da osseointegrasyon düzeyini arttırarak, dental implantların klinik başarısını arttırmak, yükleme öncesi bekleme süresini kısaltmak ve kemik hacminin yetersiz olduğu durumlarda daha kısa implantların kullanılabilmesinin önünü açmak amacıyla birçok yeni yöntem geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmaların bir kısmı implantın yiv karakteri ve şekli üzerinde dururken; diğer bir kısmı da implantın yüzey özelliklerini değiştirerek, implantların klinik başarısını arttırmaya çalışmaktadır (Bumgardner ve ark 2000, Steigenga ve ark 2003, Lin ve ark 2009).

Kemik içi implant yerleştirilmesini takiben iyileşme süresini kısaltmak, materyalin biyuyumunu arttırmak ve daha iyi bir osseointegrasyon düzeyine ulaşabilmek amacıyla yapılan araştırmalar, biyoaktif özellikteki çeşitli biyolojik veya kimyasal ürünlerle implant yüzeyinin kaplanmasıyla, topikal veya sistemik uygulamalarını içermektedir. Bu amaçla literatürde trombositten zengin plazma, simvastatin, rekombinant insan kemik morfogenetik proteini-2 (rhBMP-2) ve melatoninle birlikte rekombinant fibroblast büyüme faktörü-2 (rhFGF-2) gibi materyaller kullanılmıştır (Zechner ve ark 2003, Ayukawa ve ark 2004, Takechi ve ark 2008, Wikesjo ve ark 2008). Buna ek olarak Mg veya Ti alaşımından üretilen implant yüzeyleri biyoaktif cam seramikler (Mistry ve ark 2011), proteinler (Wojcik ve Puleo 1997), ‘çitosan’ gibi biyoaktif polimerler (Bumgardner ve ark 2007) ve HA, braşit, β-

TCP gibi kristallerle kaplanabilmektedir (Cook ve ark 1987, Chen ve ark 2011, Chai ve ark 2012).

Kalsiyum fosfat kristallerinin, çeşitli materyallerin yüzeylerine kaplanabilmesi amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir. Bununla birlikte her kaplama yönteminin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Plazma sprey tekniğinde, kaplama işlemi esnasında çok yüksek sıcaklığa ihtiyaç duyulması, kaplama kompozisyonunun, içeriğinin ve kaplama kalınlığının kontrol edilmesinin güç olması, elde edilen kaplama kalınlığının diğer tekniklere göre göreceli olarak daha fazla olması çalışmacıları başka yöntemler geliştirmeye yöneltmektedir (Gill ve Tucker 1986, Wang ve ark 1993, Weng ve ark 1994). Lazer demetiyle iyon demeti tekniklerinde ise kaplama yüzeyinin kalınlığı azaltılarak, mekanik dayanımı daha ideal olan biyolojik olarak etkin kaplama yüzeyleri elde edilebilmektedir. Ancak kaplama işleminde kullanılan cihaz ve ekipmanların pahalı olması, bu tekniklerin ticari kullanımlarındaki en büyük dezavantajdır (Peraire ve ark 2006, Narayanan ve ark 2008, Jansen ve Leâon 2009). Sıçratma tekniği yakından incelendiğinde ise, sadece RF magnetron tekniğiyle HA ve benzeri kristallerin yüzey kaplamak amacıyla kullanılabildiği görülmektedir. Bu teknik vasıtasıyla ince film tabaka halinde kaplama yüzeyleri elde edilebilmesine rağmen; kaplama yüzeyinin kristalinitesini arttırmak amacıyla sinterleme işlemi gerekmektedir. Yüksek sıcaklıklara maruz kalan kaplama ve substrat yüzeyleri arasındaki genleşme katsayılarının farklılığına bağlı olarak kaplama yüzeylerinde mikro çatlaklar görülebilmektedir (van Dijk ve ark 1996, Ong ve ark 2009). Elektrokimyasal depozisyon tekniği ise kalsiyum fosfat tabakasının oluşturulmasında daha basit ve maliyeti düşük bir yöntem olarak kabul edilmesine rağmen, elde edilen kaplama materyalinin tutunma dayanımı düşüktür. Ayrıca substrat materyali olarak kullanılan materyalin, elektriği ileten bir materyal olması da gerekmektedir (Jansen ve Leâon 2009, Scharnweber ve Bierbaum 2009). Yukarıdaki nedenlerle bu çalışmada, vida yüzeylerinin kalsiyum fosfatla kaplanmasında biyomimetik kaplama yöntemini tercih edildi. Gelişmiş cihaz ve ekipmanlara ihtiyaç duyulmaması, kaplama işleminin oda sıcaklığında yapılabilmesi ve diğer tekniklerle kıyaslandığında daha düşük maliyet gerektirmesi, düz veya homojen yüzeye sahip olmayan çeşitli ekipmanların da uygun bir şekilde kaplanabilmesine olanak sağlaması biyomimetik kaplamanın tercihinde etkili olmuştur. Bu amaçla, Tas ve Bhaduri (2004) tarafından geliştirilen ve YBS 10X

kullanılan yöntem uygulandı. Literatürde bu yöntemle titanyum yüzeylere ve çeşitli polimerin yüzeylerine kalsiyum fosfat kaplama yapılabildiği gösterilmiştir (Nouri ve ark 2007, Andric ve ark 2011, Ummethala ve ark 2011, Kung ve ark 2014, Lin ve ark 2014).

Bu yöntemi uygulayan Nouri ve ark (2007) yaptıkları çalışmada Ti alaşımı materyalleri YBS 10X ile kalsiyum fosfat kristalleriyle kaplamışlardır. Söz konusu çalışmada birinci saatin sonunda, solüsyon içerisindeki materyal yüzeylerinde kemik benzeri apatit granüllerinin oluşmaya başladığı; solüsyonda kalma süresi arttıkça apatit granüllerinin sayısının da arttığı rapor edilmektedir. Başka bir çalışmada ise Ti alaşımından üretilen materyal yüzeyleri, aynı teknikle 6 saat süreyle kaplanarak, X Işını kırınım analizi yapılmış ve kalsiyum fosfat kaplama yüzeyinin HA' ya ilaveten OCP kristalleri de içerdiği bildirilmiştir (Ummethala ve ark 2011).

Daha önce yapılan çalışmalarda (Kung ve ark 2014, Lin ve ark 2014) biyoçözünür özellik taşıyan polimerlerden olan, PLA ve çitosan kaplanan PLA iplikçikleri ise, 2 farklı çalışmada YBS 10X ile 6 saat sürede kalsiyum fosfat kristalleriyle kaplanmış. Her iki çalışmada da elde edilen kaplama yüzeylerinin braşit ve HA kristalleri içerdiği gözlenmiştir (Kung ve ark 2014, Lin ve ark 2014). Benzer biçimde, kortikal kemiği taklit edecek biçimde üretilen poli-L-laktik asit (PLLA) ve PLLA/jelatin içeren yapı iskeleleri, aynı YBS solüsyonu ile 2 saat süreyle oda sıcaklığında kaplandığında braşit ve HA kristalleri içeren materyal yüzeyi elde edildiği rapor edilmektedir (Andric ve ark 2011).

Bu yöntemin kullanıldığı başka bir çalışmada ise poli ε-kaprolakton (PCL) yapı iskeleleri YBS 10X ile muamele edilerek, kalsiyum fosfat kaplama yüzeyi elde edilmiştir. Kaplama solüsyonunda 2 saat süreyle tutulan örneklerin X-Işını kırınım analizinde, daha önceki çalışmaların sonuçlarından farklı olarak apatit kristalleri ile birlikte braşit kristalleri de tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 6 saat süreyle kaplama solüsyonunda kalan örneklerin, tamamen kalsiyum fosfatla kaplandığı ve poröz yapısını kaybettiği belirtilmektedir. Doku mühendisliği uygulamaları açısından poröz yapıdaki kaplama yüzeylerinin, hücre göçü açısından daha ideal olduğu savunulmaktadır (Zhang ve ark 2005, Yang ve ark 2008).

Kuboki ve ark (1998) yaptıkları bir çalışmada, poröz yapıdaki HA kaplamayla kombine edilen BMP' nin, solid yapıya sahip HA ile kombine edilmiş BMP' ye göre daha belirgin düzeyde kemik oluşumuna yardımcı olduğunu göstermişlerdir. Poröz yapının sahip olduğu geometri, kaplama içerisindeki vaskülarizasyonun artışına olanak sağlamakla beraber, mezenşimal hücrelerin de proliferasyonunu arttırmaktadır. Solid yapıdaki HA kaplama yüzeyi ise tam tersine, in vitro ortamda yapılan bu çalışmaya göre BMP için taşıyıcı bir sistem görevi görmemektedir. Ayrıca elde edilen bu sonuca paralel olarak, BMP ile vazoendotelial büyüme faktörün (VEGF) birlikte kullanılarak oluşturulan deneysel kemik greftinin, BMP ve VEGF' nin tek başına kullanıldığı gruplardaki greftlere göre yeni kemik oluşumu yönüyle daha üstün sonuçlar verdiği gösterilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, geliştirilen YBS 10X ile uygulanan biyomimetik kaplama tekniği sonucunda, HA, CDHA, OCP ve braşit kristalleri içeren kaplama yüzeyleri elde edilebildiği gözlemlenmektedir (Tas ve Bhaduri 2004, Nouri ve ark 2007, Andric ve ark 2011, Ummethala ve ark 2011, Kung ve ark 2014, Lin ve ark 2014). Bu teknikle elde edilen kaplama yüzeylerinde homojen ve düzgün bir yüzeyden ziyade, poröz yüzeyler elde edilmektedir. Ayrıca bu yöntemle kompleks geometriye sahip materyallerin de kaplanabildiği literatürde rapor edilmektedir (Tas ve Bhaduri 2004). Biz de yaptığımız bu çalışmada biyomimetik kaplama yönteminden yararlanarak, Ti vida yüzeylerinde, 6 saatlik sürenin sonunda homojen dağılım göstermeyen kalsiyum fosfat tabakası elde ettik. Yapılan X-Işını kırınım analizinde braşit kristallerine ait kırınım pikleri olduğu görüldü. Ayrıca numuneler üzerinde yapılan EDX analizleri de braşit kristallerin varlığını destekler nitelikte sonuçlar verdi. Bununla birlikte elde edilen kaplama kalınlığı da tarama elektron mikroskobu ve ışık mikroskobu ile ölçüldü. Literatürde Tas ve Bhaduri (2004) tarafından geliştirilen kaplama işleminde bildirilen 6 saatlik kaplama kalınlığına eşdeğer kaplama kalınlığına ulaşıldı.

Braşit içerikli materyaller, fizyolojik ortamda yarı stabil bir durumdadır. Bu özellik HA' ya göre daha hızlı rezorbe olabilmesine olanak sağlar (Vereecke ve Lemaître 1990). Çeşitli araştırmacılar, braşit kristallerini, kemik mineralizasyonunun prekürsörü olarak nitelendirmektedirler. Bu kristallerin, uygun fizyolojik ortamda HA kristallerinin oluşumunda yer alabildiği gösterilmiştir (Roufosse ve ark 1979, Yang ve

ark 2008). Yapılan in vivo çalışmalarda, braşit kristallerinin HA' ya göre daha hızlı rezorbe olduğu gösterilmiştir (Klein ve ark 1985, Reigstad ve ark 2011).

Elektrokimyasal depozisyon yöntemiyle braşit kaplanan, HA kaplanan, kaplama yapılmayan ve plazma sprey yöntemiyle kalsiyum fosfat kaplanan poröz yapıların in vivo ve in vitro olarak değerlendirildiği bir çalışmada, braşit ve HA kristallerinin pH'nın 5,5 olduğu ortamda birkaç gün içerisinde rezorbe olduğu bildirilmektedir. pH'nın 7,3 olduğu ortamda ise braşit, 21 gün sonunda tamamen rezorbe olurken; hidroksiapatitin ise aynı pH değerinde sadece bir kısmı rezorbe olmaktadır. In vivo değerlendirmede ise; 3 haftanın sonunda braşit kristallerinin vücut sıvısında rezorbe olduğu, ancak HA kristallerinin halen bazı bölgelerde rezorbe olmadan kalabildiği rapor edilmektedir. Ayrıca bu çalışmada her iki kristal yapının da, kaplama içermeyen grupla kıyaslandığında, kemik gelişimini hızlandırdığı belirtilmektedir (Biemond ve ark 2011).

Benzer bir biçimde braşit kristallerinin implant yüzeylerine elektrokimyasal depozisyon yöntemiyle kaplandığı başka bir çalışmada; braşit kristallerin büyük bir kısmının 3. haftada rezorbe olduğu belirtilmektedir. Tavşanların tibia ve femurlarına yerleştirilen kaplanan gruba ve kaplama yapılmayan kontrol grubuna ait implantlar arasında 6. ve 12. haftalarda, yeni oluşan kemik yüzdesi yönüyle bir farka rastlanmamıştır. Ancak braşit kaplı vidaların istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kemik implant kontağı değerlerine sahip oldukları rapor edilmektedir. Buna ek olarak kaplama yüzeyindeki braşit kristallerinin, sitotoksik etkiye ya da immün reaksiyona sebep olmadığı belirtilmektedir (Reigstad ve ark 2007).

Reigstad ve ark (2011) benzer bir başka çalışmada, elektrokimyasal depozisyon yöntemiyle braşit kristali ve plazma sprey yöntemi ile HA kaplanmış iki değişik nitelikte kaplama yüzeyine sahip Ti implantların, uzun dönem sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Braşit kaplama için 15 ± 5 µm, HA kaplama için ortalama 40 µm kaplama kalınlıklarına ulaşılmıştır. Tavşan modelinde, proksimal tibia medial yüzeyine yerleştirilen implantların, postoperatif 6. , 12. ve 52. haftalardaki biyomekanik ve histolojik özellikleri incelenmiştir. Biyomekanik inceleme sonucunda 6. ve 12. haftalarda, HA kaplı implantların istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksek sökme torku değerlerine sahip olduğu rapor edilmektedir. Bu fark, HA

kristallerinin sahip olduğu daha güçlü biyoaktif özelliğe bağlanmaktadır. Ancak ilerleyen dönemde sökme torku değeri, 52 haftanın sonunda braşit kaplı implantlar lehine değişiklik gösterse de; bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Yapılan histolojik incelemede ise, braşit kaplı implant grubunda herhangi bir değerlendirme döneminde, kaplama materyaline ait kalıntılara rastlanmamıştır. Postoperatif 6. haftada yapılan mikroskobik değerlendirmede, implant çevresi dokuda kallus formasyonu ve olgunlaşmamış kemik dokusu olduğu rapor edilmektedir. Diğer inceleme dönemleri de göz önünde bulundurulduğunda braşit kaplama yüzeyinde, normal bir remodeling fazı görüldüğüne kanaat getirilmektedir. HA kaplı yüzeyde ise, bütün değerlendirme dönemlerinde, histolojik olarak rezorbe olmamış HA artıklarına rastlanmaktadır. Histolojik kesitlerde sıklıkla, HA kristallerini içine almış multinükleer dev hücreler görülmektedir. Bu kristaller, kemik dokusuna gömülmüş ve genel olarak implant yüzeyinden uzakta bulunmaktadır (Reigstad ve ark 2011).

Bu çalışmalara (Reigstad ve ark 2007, Biemond ve ark 2011, Reigstad ve ark 2011) ait sonuçlardan yola çıkarak, deneklere yerleştirilen braşit kaplama yüzeyine sahip implantların toksik reaksiyona neden olmadığı ve kristallerin büyük bir çoğunluğunun, bir süre sonra rezorbe olduğu anlaşılmaktadır. Rezorpsiyon miktarı, histolojik kesitler göz önünde bulundurulduğunda; postoperatif 3. haftada belirgin hale gelmektedir. İlerleyen dönemlerde ise braşit kristallerinin çok büyük bir kısmını etkilemektedir. Kaplama yüzeyinin rezorbe olmasıyla birlikte, kemikle titanyum yüzey arasında kaplama materyali kalmamaktadır. Bizim yaptığımız çalışmada da postoperatif 6. haftada, mikrotomografik kesitlerde kaplama yüzeyi gözlenmedi.

Günümüzde doku mühendisliğinde, poli ε-kaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polilaktik koglikolik asit (PLGA) gibi sentetik biyo çözünür polimerler ve kollagen, jelatin gibi doğal materyaller kullanılmaktadır (Kang ve ark 1999, Yoshimoto ve ark 2003, Badami ve ark 2006, Shih ve ark 2006, Pan ve Ding 2012, Knight ve Payne 2013). Elde edilen bu polimer yapılar tek başlarına veya osteokondüktif özellikteki çeşitli materyallerle beraber kullanılabilmektedir (Tamimi ve ark 2008c, Salama ve El-Sakhawy 2014).

Salama ve El-Sakhawy (2014) karboksimetil selüloz ve çitosan içerikli biyoçözünür özelliğe sahip polimer yapıyı biyomimetik kaplama yöntemleriyle,

kalsiyum fosfat kristalleri ile kaplayarak, hibrit materyaller elde etmişlerdir. Kullanılan kaplama solüsyonlarının konsantrasyonlarının arttırılması, kaplanan kristal yapının Ca/P oranında artışa neden olurken; bir diğer taraftan polimer yapının, daha etkin bir biçimde sığır serum albümin rezervuarı görevi görmesine yardımcı olmaktadır. Çalışmada birim zaman içerisindeki ilaç salınım düzeyleri, sığır serum albüminin zaman içerisindeki salınım değerleri göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Bu çalışma, biyomimetik kaplama yöntemiyle kalsiyum fosfat kristalleri kaplanan hibrit materyallerin ilaç salınım sistemlerinde kullanılabileceği göstermektedir.

Ayrıca jelatinle kaplanmış PCL yapı iskelelerinin, YBS 10X solüsyonunda 2 saat süreyle muamele edilmesiyle, braşit ve HA kaplı yüzey elde edilmiştir. Elde edilen hibrit materyalin kemiğe ait ekstraselüler matriksi (ECM) yapısal olarak taklit edebildiği ve in vitro ortamda preosteoblastik hücrelerin yerleşim gösterip, prolifere olabileceği bir ortam vazifesi gösterdiği belirtilmektedir (Li ve ark 2008).

Bir başka çalışmada ise; canlılarda kemik fraktürü sonrasında oluşan kallus formasyonunda, braşit kristalleri ve tip I kollagenin yer almasından esinlenilerek, kemik iyileşmesi sırasında ihtiyaç duyulan organik ve inorganik materyalleri barındıran bir hibrit materyal elde edilmiştir. Bu materyal biyolojik olarak uyumlu ve biyoçözünür özelliğe sahip braşitle, osteokondüktif özellikteki kollagenin karışımından oluşmaktadır. In vitro ortamda incelenen hibrit materyalin, saf braşit içeren materyale göre 3 kat daha fazla osteoblast tutulumuna olanak sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca eklenen kollagen, hibrit materyalin mekanik özelliklerine de olumlu yönde katkı sağlamaktadır. Bu yönüyle incelendiğinde edilen ürünün, spongiyoz kemiğe benzer düzeyde, mekanik dayanıklılık taşıdığı rapor edilmektedir (Tamimi ve ark 2008c).

Literatürde yer alan bu çalışmalar (Li ve ark 2008, Tamimi ve ark 2008c, Salama ve El-Sakhawy 2014), hibrit özellikteki biyoçözünür polimer yapıların da, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilirliğini açıklar niteliktedir. Hibrit materyaller; içeriklerinde yer alan değişik sentetik polimerlerin ve doğal ya da sentetik yöntemlerle elde edilen osteokondüktif materyallerin, olumlu özelliklerini tek bir çatı altında toplayabilmek amacıyla geliştirilmektedir. Biz de yaptığımız çalışmada, braşit

kristalleriyle kaplanan Ti alaşım vida yüzeylerine, devekuşu yumurtasından elde edilen, çözünebilen yumurta kabuk zarı proteini ekleyerek hibrit bir yüzey elde ettik. Literatürde çeşitli materyallerin kontrollü salınımında kullanılabileceği gösterilen (Liu ve ark 2003, Chen ve ark 2006, Salama ve El-sakhawy 2014) biyomimetik yöntemle kaplanmış kalsiyum fosfat kristallerinin, bizim çalışmamızda yumurta kabuk zarı proteini salınımı yapması amaçlandı.

Yumurta kabuk zarı, tip I, V, X kollagen, osteopontin ve sialoprotein içeren bir yapıdır. Ancak sahip olduğu çapraz disülfit bağları nedeniyle çözünürlüğünün oldukça düşük olması; ürünün doku mühendisliği alanındaki uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Yumurta kabuk zarı proteini ise, kollagen matriks oluşumunu hızlandıran, biyouyumlu bir materyal olarak nitelendirilmektedir (Carrino ve ark 1996, Takahashi ve ark 1996, Nys ve ark 2001). Ayrıca tripsin enzimi içeren ortamda yapılan in vitro incelemede, yumurta kabuk zarı proteini, yumurta kabuk zarıyla benzer düzeyde biyoçözünür özellik taşıyan bir biyomateryal olduğu belirtilmektedir (Li ve Guo 2007)

Yumurta kabuk zarı proteininin, tip I kollagene göre kıyaslanabilir düzeyde fibroblast adezyonu ve proliferasyonuna olanak sağladığı in vitro ortamda gösterilmiştir. (Yi ve ark 2003).

Bir başka çalışmada ise benzer şekilde; yumurta kabuk zarı proteinin, otoklavize edilmiş yumurta kabuk zarına göre belirgin düzeyde daha yüksek fibroblast adezyonu ve proliferasyonuna ortam sağladığı gösterilmiştir. Elde edilen protein yapı daha yüksek bir hidrofilik yüzey özelliği taşımaktadır. Bu durum hücresel proliferasyonu desteklemekte ve ürünün biyouyumluluğuna olumlu yönde katkı sağlamaktadır (Yi ve ark 2004).

Polilaktik asit (PLA) membranı, poli ε-kaprolakton (PCL) nano iplikçikleri gibi sentetik biyopolimerler temel alınarak, yumurta kabuk zarı proteini ile modifiye edilmiş materyaller elde edilmiştir. Bu modifiye edilmiş materyallerin, sentetik biyopolimer yapılara göre, hücre proliferasyonu açısından daha uygun yüzey özellikleri taşıdıkları gösterilmektedir. Bu çalışmalarda da benzer şekilde; yumurta kabuk zarı proteinin, materyalin hidrofilik yüzey özelliğini arttırdığı bildirilmektedir. Temel olarak yüksek mekanik dirence sahip, biyouyumlu ve biyoçözünür sentetik

biyopolimer yapıların kullanılması, yumurta kabuk zarı proteinlerinin zayıf mekanik özelliklerini ortadan kaldırmaya ve doku mühendisliği açısından daha uygun yapı iskeleleri elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Jia ve ark 2008, Lu ve ark 2009).

Jia ve ark (2012) bir başka çalışmada, polilaktik koglikolik asit nanofiberleriyle (PLGA) yumurta kabuk zarı proteinini çeşitli oranlarda bir araya getirerek elde ettikleri hibrit materyali, biyouyumluluk, yüzey ıslanabilirliği ve mekanik özellikleri yönüyle değerlendirmişlerdir. Hibrit materyal içerisindeki yumurta kabuk zarı proteini miktarındaki artışın, biyouyumluluğu ve yüzey ıslanabilirliğini arttırdığını; ancak mekanik dayanıklılığı azalttığını rapor etmişlerdir.

Söz konusu in vitro çalışmalarda (Yi ve ark 2003, Yi ve ark 2004, Jia ve ark 2008, Lu ve ark 2009, Jia ve ark 2012), yumurta kabuk zarı proteininin, biyouyumlu ve biyoçözünür özellikte olduğu; bağ dokusuna ait hücresel elemanlardan olan fibroblastların adezyonuna ve proliferasyonuna olanak sağladığı belirtilmektedir. HA ve jelatin içeren yapı iskeleleri, Narbat ve ark (2006) tarafından bildirilen yöntemle elde edilebilmektedir. Bizim çalışmamızda ise, daha önceden braşit kristalleri ile kaplanmış vida yüzeylerine, Narbat ve ark (2006) tarafından tariflenen yöntemle yumurta kabuk zarı proteini adzorbe edilerek, elde edilen hibrit yüzeyin in vivo ortamdaki etkilerinin histolojik ve mikrotomografik yöntemlerle incelenmesi amaçlandı.

Günümüzde ortopedi ve diş hekimliği alanında yapılan in vivo hayvan çalışmalarında köpek, koyun, keçi, domuz ve tavşanların kullanıldığı rapor edilmektedir (Pearce ve ark 2007). Kas ve iskelet sistemiyle ilgili çalışmaların yaklaşık % 35' inde deney hayvanı olarak tavşan kullanılmaktadır (Neyt ve ark 1998). Kullanım kolaylığı ve yapılması planlanan çalışma için uygun boyutta olması nedeniyle tercih edilen tavşanlar, 6 haftada seksüel olgunluğa ve hemen devamında iskeletsel olgunluğa erişmektedirler (Gilsanz ve ark 1988). Bir deney tavşanı için uluslararası standart, her bir tibiaya üçer adet olmak üzere toplamda 6 implanttır. Tavşanların kullanıldığı çalışmalarda, implantların yerleştirilmesinde tibia mediali proksimal bölge sıklıkla kullanılmaktadır. Çünkü bu bölgedeki kemiğe ulaşım kolay ve atravmatiktir. Monokortikal olarak yerleştirilen ve bir kısmı kemik iliği ile temasta

bulunan implantların çevresindeki iyileşme düzeyleri kolaylıkla takip edilebilmektedir (Park ve ark 2005, Park ve ark 2007, Suh ve ark 2007, Athraa ve ark 2008).

İnsan ve tavşana ait kemik yapının içeriği değerlendirildiğinde; kemik mineral yoğunluğuyla, uzun kemiklere ait kırılma sertliğinin benzer olduğu rapor edilmektedir (Wang ve ark 1998). Ayrıca tavşandaki kemik remodelingi, çeşitli primatlar ve kemirgenlerle kıyaslandığında, tavşandaki iskeletsel değişim ve kemik devinimi, özellikle havers sisteminin yeniden şekillenmesi açısından daha hızlıdır (Gilsanz ve ark 1988, Newman ve ark 1995, Castaneda ve ark 2006).

Kemik metabolizmasının düzenlenmesinde östrojenin etkisi olduğu ve bu hormonun eksik olduğu durumlarda kemik iyileşmesinin olumsuz yönde etkilendiği rapor edilmektedir (Kagel ve ark 1995). Bu nedenle kemikteki iyileşmenin menstrual döngüden etkilenmemesi için, deney hayvanı olarak erkek Yeni Zelanda tavşanı seçildi. Hayvanlara ait farklılıkları ortadan kaldırabilmek amacıyla, deney hayvanlarının her birine, hem deney hem de kontrol grubuna ait eşit sayıda vida yerleştirildi. Ayrıca mikrotomografik inceleme açısından örneklerin uygun hale gelebilmesi için, Park ve ark (2005) yaptığı çalışmaya benzer şekilde, her bir tibianın mediali, proksimal bölgeye yerleştirilen vidalar arasında 10 milimetre mesafe bırakıldı. Yaptığımız çalışmada her bir tavşana 4 adet vida yerleştirildi.

Mikrotomografik inceleme, kemiğin yapısının incelenmesinde etkin bir biçimde kullanılabilen bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin uygulanabilmesi için, incelenecek numunenin canlıdan alınıp, laboratuvar ortamına taşınması gerekmektedir. Numunenin histolojik olarak incelenmesine engel teşkil etmeyen bu yöntem; histolojik inceleme yöntemine göre daha kolay uygulanabilmektedir. Ancak mikrotomografik incelemenin kemiğe ait hücresel aktivite hakkında bilgi vermiyor oluşu ve artifakt oluşabilmesi; bu yöntemin, histolojik inceleme yöntemine göre en belirgin dezavantajı olarak kabul edilmektedir (Butz ve ark 2006, Burghardt ve ark 2011). Mikrotomografik inceleme yöntemi, X-Işınlarından yararlanmaktadır. Bunun neticesinde araştırmacılara, kemik trabeküllerine ait 3 boyutlu inceleme imkânı sunmaktadır. Histomorfometrik değişkenlerden olan kemik hacmi yoğunluğu (Kh/Th), trabeküler kalınlık, trabekül sayısı ve trabeküler boşluk, mikrotomografik olarak incelenebilmektedir (Odgaard 1997).

Kemiğe ait trabeküler yapının incelenmesinde, kemikten alınan parçadan elde edilen 2 boyutlu histolojik kesitlerin histomorfometrik analizi, trabeküler mimarinin değerlendirilmesinde en etkin ve yaygın yöntem olarak kabul edilmektedir. Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, histomorfometrik analizde yer alan parametreler tanımlanmıştır ve trabeküler kemik hacmi; ortalama trabeküler kalınlıkla, ortalama trabeküler yoğunluğun çarpımıyla hesaplanmaktadır. İnsanlarda yaşlanmayla birlikte meydana gelmekte olan trabeküler kemik hacmindeki kayıpların, trabeküler kalınlıktaki azalmadan ziyade; trabeküler yoğunluktaki azalmaya bağlı olduğu savunulmaktadır (Parfitt ve ark 1983).

Histomorfometrik analizle elde edilen parametrelerle, mikrotomografik incelemeyle elde edilen morfometrik parametrelerin, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korelasyon gösterdiği rapor edilmektedir (Muller ve ark 1998, Park ve ark 2005, Butz ve ark 2006).

İliak kemikten alınan biyopsi örneklerinin, mikrotomografik yöntemle incelendiği çalışmada, yaşlanmayla kemik hacmi yoğunluğu oranı (Kh/Th) ve trabeküler sayının negatif; trabeküler boşluğun ise pozitif yönde ilişkili olduğu rapor edilmektedir. Bu parametrelerden elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlıdır. Buna ek olarak yaşlanmayla, trabeküler kalınlık arasında istatistiksel olarak belirgin bir korelasyon bulunmamaktadır (Chappard ve ark 2008).

Ding ve ark (2002) benzer bir çalışmada ise; yaşlanmayla beraber insan tibiasında meydana gelen yapısal değişiklikler, morfometrik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada 16 ile 85 yaş aralığındaki, postmortem 10 kadın ve 30 erkekten alınan tibia örnekleri kullanılmıştır. Kemik hacmi yoğunluğu (Kh/Th) ve kemik yüzey yoğunluğu (Ky/Th) ve trabeküler hacmin yaşlanmayla beraber azaldığı; meydana gelen değişikliğin, istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. Ortalama trabeküler boşluk ise, yaşlanmayla birlikte istatistiksel olarak artış göstermiştir.

Yaşlanmayla ilişkilendirilebilen osteoporoz, kemiğin trabeküler yapısındaki bozulma ve kemik kalitesindeki azalmayla karakterize bir hastalıktır. Bu durum kemiğin kırılganlığını arttırmakta; hastalığa bağlı olarak kalça kemiklerinde ve vertebralarda fraktürler meydana gelebilmektedir (Scott 1997).

Konuyla ilgili olarak yapılan çalışmada vertebra fraktürü olmayan 46 erkek hastayla, vertebrasında en az bir fraktür olan 62 erkek hastadan alınan biyopsi örnekleri histomorfometrik yöntemle karşılaştırılmıştır. İnceleme sonucunda, vertebra fraktürü olan hasta grubunda, trabekül sayısındaki azalışın ve trabeküler boşluktaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmektedir. Ancak kemik hacmi yoğunluğu (Kh/Th), trabeküler kalınlık ve kemik mineral yoğunluğu (KMY) yönüyle gruplar arasında fark görülmemektedir (Legrand ve ark 2000).

İnsan kemikleri üzerinde yapılmış çalışmalara ek olarak, yaşlanmanın kemik yapısı üzerindeki etkileri fareler üzerinde de incelenmiştir. Çalışmalarda elde edilen mikrotomografik ve histolojik bulgular değerlendirilmiştir (Nafei ve ark 2000, Glatt ve ark 2007, Duque ve ark 2009).

Bu amaçla Glatt ve ark (2007) yaptıkları çalışmada, yaşlanmanın farelerin vertebra, femur ve tibiaları üzerindeki etkilerini mikrotomografik ve histolojik olarak değerlendirmişlerdir. İncelenen kemiklere ait trabeküler bölgelerin mikrotomografik sonuçları incelendiğinde yaşlanmayla beraber total kemik mineral dansitesinde (KMY) ilk 12 aylık yaşam sürecinde, düzenli bir artış görülmektedir.

Vertebra ve femura ait kemik hacmi yoğunluğu (Kh/Th) oranı ve trabekül sayısı yaşla birlikte azalırken; trabekül kalınlıkları genel olarak korunmakta veya yavaş biçimde artış göstermektedir. Histomorfometrik değerlendirmede de benzer sonuçlara ulaşmaktadır. Yaşlanmayla birlikte meydana gelen kemik kalitesindeki kayıp düzeyi, dişilerde ve uzun kemiklerde daha belirgin olarak gözlemlenebilmektedir. Bu çalışmada kemik hacmi yoğunluğu (Kh/Th) oranındaki azalmanın trabekül sayısındaki azalmaya veya bir başka deyişle, ince trabeküllerin rezorbsiyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu azalma, kemiğe gelen yüklerin daha etkin bir biçimde karşılanabilmesi amacıyla remodeling meydana gelmesine sebep olmaktadır. Böylece vücut, daha az sayıdaki trabekülle, aynı düzeydeki yükü karşılayabilmek için trabeküler kalınlığı arttırmaktadır. Yaşlanmayla beraber meydana gelen ortalama trabeküler kalınlık artışının, bu mekanizmaya göre şekillendiği savunulmaktadır Yapılan çalışma, fare kemiklerine ait yaşlanmaya bağlı değişikliklerin, insanlardakine benzer niteliklere sahip olduğunu göstermektedir (Glatt ve ark 2007).

Duque ve ark (2009) farelerin distal femurları üzerinde yapığı benzer bir çalışmada da, yaşlanmayla beraber, mikrotomografik bulgularda genel olarak benzer sonuçlara ulaşılmaktadır. Dört aylık farelerin 16 ay boyunca takibi sonucunda, kemik hacmi yoğunluğu Kh/Th oranı, kemik mineral yoğunluğu (KMY) ve trabekül sayısında azalma gözlemlenirken; trabekül kalınlığında hafifçe bir artış rapor edilmektedir. Buna ek olarak yaşlanmayla beraber hem erkek, hem de dişi farelerde, ortalama trabeküler boşluk miktarı artış göstermektedir. Ayrıca yapılan histolojik incelemede, distal femurda bulunan osteoblast ve osteoklast sayısının genç farelerde, genel olarak daha fazla olduğu belirtilmektedir. Kemik iliğindeki yağ oranının yaşlanmayla birlikte artış gösteriyor olması da; yaşlanmaya bağlı kemik kaybının göstergesidir.

Kemik yüzey yoğunluğu (Ky/Th) ise koyunların tibiası üzerinde yapılan bir çalışmada değerlendirilmektedir (Nafei ve ark 2000). Bu çalışmada iskeletsel gelişimi devam eden ve tamamlanmış denekler karşılaştırılmaktadır. İskeletsel gelişimin erken dönemlerinde kemik yüzey yoğunluğu (Ky/Th) değeri, gelişimin tamamlandığı döneme göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca yaşlanmayla beraber bu değerdeki azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Kemik yüzey yoğunluğu (Ky/Th) değerindeki artışın trabekül sayısı ve hacmindeki artışa bağlı olarak değişim göstermesinden dolayı, bu parametrenin kemiğin mekanik özelliklerini yansıttığı savunulmaktadır.

Yaşlanmanın ve osteoporözün kemik kalitesinde meydana getirdiği değişikliklerin mikrotomografik incelemesine ek olarak araştırmacılar, deneklere yerleştirilen implantların çevresindeki kemik dokusunu da benzer bir biçimde mikrotomografik olarak incelemişlerdir (Liu ve ark 2012, Yamaki ve ark 2012, Zhang ve ark 2013, Fang ve ark 2014).

Fang ve ark (2014) yaptıkları çalışmada ise köpeklerin premolar dişleri çekilerek, çekim soketlerinin iyileşmesini takiben yerleştirilen dental implantların osseointegrasyon süreci 1. , 4. , ve 8. haftalarda mikrotomografik olarak incelenmiştir. Sekizinci haftada implantların osseointegrasyon sürecinin tamamlandığı ve yüklenebilir olduğu kabul edilmektedir. Postoperatif dönemde trabekül sayısı ve kemik hacmi/toplam hacim (Kh/Th) dönemsel olarak artış gösterirken; trabeküler boşluk çalışma süresince takip edilen sürede azalmıştır. Trabeküler kalınlık ise artış

eğilimi göstermesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir. Bu çalışmada trabekül sayısı ve kemik hacmi/toplam hacmindeki (Kh/Th) artışının, implantların osseointegrasyon düzeyindeki artışın mikrotomografik bir göstergesi olabileceği belirtilmektedir.

Zhang ve ark (2013) yaptıkları çalışmada ise köpeklerin femurlarına yerleştirilen Sr-hardistonit, hardistonit ve hidroksiapatit kaplanmış titanyum alaşım vidalarla, kontrol grubuna ait işlem görmemiş vidaların osseointegrasyon düzeyleri, 12. haftanın sonunda mikrotomografik, histolojik ve histomorfometrik olarak incelenmiştir. Mikrotomografik incelemede, gruplara ait implantların çevresindeki 1 mm'lik kemiği içerisine alan kısımdaki, trabekül sayısı, trabeküler kalınlık, kemik hacmi/toplam hacim oranı (Kh/Th) ve kemik mineral yoğunluğu değerleri (KMY) karşılaştırılmıştır. Kaplama yapılan biyoaktif yüzeylerin osseointegrasyon düzeyinde artış olduğu histomorfometrik analiz, sökme torku testi ve mikrotomografik incelemeyle belirlenmiştir. Biyoaktif yüzeye sahip deney gruplarındaki osseointegrasyon düzeyindeki artışa paralel olarak, mikrotomografik incelemeyle belirlenen kemik hacmi/toplam hacim oranında (Kh/Th), trabekül sayısında, trabekül kalınlığında ve kemik mineral yoğunluğundaki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yapılan histolojik değerlendirmede ise, kontrol grubuna ait, kaplama yapılmayan titanyum vida yüzeyiyle, kemik arasında fibröz doku bandı gözlenmiştir. Vida yüzeyinde görülen fibröz doku bandı, vidaların kemikle olan bağlantısını olumsuz yönde etkilemiştir.

Liu ve ark (2012) ise düşük yoğunluklu ultrasonik dalga uygulanan titanyum implantların osseointegrasyon düzeylerinin, işlem görmemiş kontrol grubu implantlarla karşılaştırmışlardır. Tavşanların tibia ve femurlarına yerleştirilen implantlar, deneklerin 0, 2, 4, 6, ve 8. haftalarda sakrifiye edilmesiyle mikrotomografik ve histolojik açıdan değerlendirilmişlerdir. Mikrotomografik incelemede, kemik mineral yoğunluğu (KMY), kemik hacmi/ toplam hacim (Kh/Th), trabeküler kalınlık çalışma grubunda daha yüksek bulunmuştur. Trabeküler boşluk değerleri ise kontrol grubunda daha yüksektir. Sökme torku değeri de çalışma grubunda anlamlı düzeyde yüksektir. Histolojik olarak ise implant çevresinde oluşan yeni kemik oluşumu, deney grubunda daha yüksek bulunmuştur.

Bir başka çalışmada ise, elektrik akımıyla yüzey pürüzlendirme yapılan titanyum implantlarla, işlem görmemiş titanyum implant yüzeyleri tavşan femur bölgesine monokortikal olarak yerleştirilerek mikrotomografik ve histolojik olarak incelenmiştir (Yamaki ve ark 2012). Postoperatif dönemde yapılan mikrotomografik incelemede, 1. hafta sonunda çalışma grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark gözlenirken; 2. ve 4. haftalarda her iki grup arası implant çevreleri karşılaştırıldığında, çalışma grubunda daha yüksek düzeyde kemik oluşumu görülmesine rağmen, gruplar arasında istatistiksel fark görülmemiştir. Yapılan histolojik incelemede ise, çalışma grubuna ait preparatlarda, implant yüzeyine yakın bölgelerde daha fazla osteosit görülmektedir. Kontrol grubuna ait implantlarda ise olgunlaşmış kemik hücrelerine rastlanmamıştır. Bu çalışmada, mikrotomografik incelemeyi takiben yapılan dekalsifiye histomorfometrik incelemenin, implant çevresi dokudaki osteogenezin değerlendirilmesinde tamamlayıcı ve güvenilir bir yaklaşım olduğu savunulmaktadır.

Söz konusu çalışmalara ait histolojik ve mikrotomografik incelemeler değerlendirildiğinde; kemiğin kalitesindeki azalmaya bağlı olarak, kemik hacmi/ toplam hacim (Kh/Th), trabekül sayısı, kemik mineral yoğunluğu (KMY) ve kemik yüzey yoğunluğu (Ky/Th) değerlerinde düşüş görülmektedir. Buna zıt ve belirgin bir biçimde trabeküler boşlukta artış dikkat çekmektedir. Trabeküler kalınlık ise, kemik kalitesindeki azalmaya bağlı olarak aynı kalmakta veya hafifçe artış göstermektedir (Nafei ve ark 2000, Ding ve ark 2002, Glatt ve ark 2007, Chappard ve ark 2008, Duque ve ark 2009). Ayrıca implant çevresinin mikrotomografi incelemesinde de osseointegrasyon düzeyindeki artışla birlikte, kemik hacmi/toplam hacim (Kh/Th), trabekül sayısı, trabekül kalınlığı ve kemik mineral yoğunluğunda (KMY) artış olduğu rapor edilmektedir. Trabeküler boşluk ise tam tersine azalma eğilimindedir (Liu ve ark 2012, Zhang ve ark 2013, Fang ve ark 2014) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Yaşlanmanın, osteoporözün ve osseointegrasyon düzeyindeki artışın, literatürde yer alan çalışmalara ait mikrotomografik ölçütler üzerindeki etkileri.

Mikro BT Ölçütleri	**Yaşlanmanın Etkisi**	**Osteoporözün Etkisi**	**Artan Osseointegrasyon Düzeyinin Etkisi**
Kh/Th	↓ ↓ ↓ ↓	→	↑ ↑ ↑
	Ding ve ark (2002) Glatt ve ark (2007) Chappard ve ark (2008) Duque ve ark (2009)	Legrand ve ark (2000)	Liu ve ark (2012) Zhang ve ark (2013) Fang ve ark (2014)
KYY (Ky/Th)	↓ ↓		
	Nafei ve ark (2000) Ding ve ark (2002)		
Tra. S.	↓ ↓	↓	↑ ↑
	Chappard ve ark (2008) Duque ve ark (2009)	Legrand ve ark (2000)	Zhang ve ark (2013) Fang ve ark (2014)
Tra. B.	↑ ↑ ↑	↑	↓ ↓
	Ding ve ark (2002) Chappard ve ark (2008) Duque ve ark (2009)	Legrand ve ark (2000)	Liu ve ark (2012) Fang ve ark (2014)
Tra. K.	→ ↑ ↑	→	↑ ↑ ↑
	Glatt ve ark (2007) Chappard ve ark (2008) Duque ve ark (2009)	Legrand ve ark (2000)	Liu ve ark (2012) Zhang ve ark (2013) Fang ve ark (2014)
KMY	↑ ↓	→	↑ ↑
	Glatt ve ark (2007) Duque ve ark (2009)	Legrand ve ark (2000)	Liu ve ark (2012) Zhang ve ark (2013)

Mikrotomografik incelemeyle implant çevresinin değerlendirildiği çalışmalarda akım ve voltaj değerleri 96 µA, 101 kV (Sukumaran ve ark 2013), 110 µA, 90 kV (Yamaki ve ark 2012), 80 µA, 80 kV (Zhang ve ark 2013) olarak belirlenmiştir. Ayrıca vida çevresindeki inceleme alanı, 1 mm (Yamaki ve ark 2012, Zhang ve ark 2013), 0,5 mm (Sukumaran ve ark 2013) olarak belirlenmiştir. Piksel boyutu ise 15 µm (Zhang ve ark 2013), 21 µm (Liu ve ark 2012) ve 37,41 µm (Sukumaran ve ark 2013) olarak belirlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise, akım ve voltaj değerleri 100 µA ve 100 kV olarak belirlenmiştir. İnceleme 1 mm'lik çevre medullar dokuda, 12 µm piksel boyutunda yapılmıştır.

Mikrotomografik değerlendirme sonucunda; deney grubuna ait vidaların, kontrol grubuna göre, ortalama trabekül sayısını ve kemik yüzey yoğunluğunu (Ky/Th) istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttırdığı gözlenmiştir. Bu verilere zıt olarak, beklendiği biçimde ortalama trabeküler boşluk miktarı deney grubunda, kontrol grubuna göre daha az bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan bu fark, diğer parametrelerden elde edilen ve istatistiksel olarak anlam ifade etmeyen sonuçlara göre daha belirgindir. Kemik hacmi/toplam hacim (Kh/Th), trabeküler kalınlık ve kemik mineral yoğunluğu ise her iki grupta benzer düzeylerdedir. Bu veriler arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı değildir. Literatürde yer alan ve çeşitli yaklaşımlarla biyoaktivitesi arttırılmaya çalışılan yüzeylerle, kontrol grubuna ait işlem görmemiş yüzeyleri karşılaştıran çalışmalara (Yamaki ve ark 2012, Liu ve ark 2012, Zhang ve ark 2013) ait mikrotomografik verilerle kıyaslandığında, bu çalışmada elde edilen kaplama yüzeyine ait mikrotomografik verilerin olumlu yöndeki etkilerinin sınırlı olduğu düşünülmektedir. Kaplama materyali, trabekül sayısı ve kemik yüzey yoğunluğu artışında, istatistiksel olarak belirgin fark yaratmaktadır. Bu fark vida çevresinde oluşan kemiğin, vidaya ait mekanik özellikleri olumlu yönde etkilediğini düşündürmektedir. Trabeküler boşluk değerinin de beklendiği üzere azalma eğilimi göstermesi, bu durumu destekler niteliktedir. Ancak diğer parametrelerde istatistiksel olarak benzer sonuçlara ulaşılması, materyalin olumlu özelliklerini arttırabilmek adına, kullanılan kaplama tekniğiyle elde edilen kalsiyum fosfat kristali içeriğinin biyoçözünürlüğünün azaltılması gerektiğini düşündürmektedir. Vücut sıvılarında, özellikle kanlanmanın daha yüksek olduğu ve metabolik aktivitenin etkilerinin daha hızlı bir biçimde görüldüğü bölgelerde,

biyomimetik yöntemle, YBS 10X solüsyonu kullanılarak kaplanan braşit kristallerinin kemik iyileşmesinin erken dönemlerinde hızlı bir biçimde rezorbe olduğu ve bu nedenle kemik gelişimi üzerindeki etkilerinin de, iyileşmenin erken dönemlerinde sonlandığı düşünülmektedir.

He ve ark (2009) yaptıkları çalışmada biyomimetik yöntemle elde edilen kalsiyum fosfat yüzeyiyle kaplı Ti implantlar, tavşan tibia modeline yerleştirilerek, kaplama yapılmamış Ti implantlarla karşılaştırılmaktadır. Postoperatif olarak ikinci, dördüncü ve sekizinci haftalarda histolojik olarak değerlendirme yapılmıştır. Kaplama yapılan implantlarda, kortikal bölgedeki kemik implant kontağı yönüyle dördüncü ve sekizinci haftalarda pozitif yönde sonuçlar alınmıştır. Medullar kavitede ise; kemik implant kontağı yönüyle yaklaşık % 29 daha yüksek yüzdede kemik oluşumu olmasına rağmen, her iki grup arasında istatistiksel farka rastlanmamıştır. Erken dönemdeki olumlu sonuçların dördüncü ve sekizinci haftalarda olmayışının; yüzey kaplamasının, erken dönemde rezorbe olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Zagury ve ark (2007) yaptıkları çalışmada YBS ile 37^0C' de, 21 günde HA ile kaplanan Ti implantlarla, kaplama yüzeyine sahip olmayan Ti implantlar, tavşan tibiasına yerleştirilmiştir. Tavşanlar 3 ay sonunda sakrifiye edilerek implant çevresi dokular histolojik olarak incelenmiştir. Her iki grup arasında osseointegrasyon yüzdesi yönüyle bir fark bulunamamıştır. Biyomimetik yöntemle elde edilen kalsiyum fosfat kaplamalarının kemik rejenerasyonunu stimüle ettiği görüşü hakimdir. Ancak vücut sıvılarında daha hızlı çözünmeleri ve biyoaktivitelerinin fazla olması nedeniyle, hızlı bir biçimde çözünüp rezorbe olan materyallerden ziyade, daha yavaş çözünebilen materyallerin, yeni kemik rejenerasyonu bakımından daha olumlu yönde sonuçlar verebileceği düşünülmektedir (Bernstein ve ark 2008).

Tavşanlarda kemik deviniminin (turnover), insanlara göre 3 kat daha hızlı olduğu; implant yüzeyine komşu kemikteki trabeküler kemik kafesinin ise yeterli olgunluğa 6 haftada ulaştığı rapor edilmektedir. Elde edilen bu bilgiden yola çıkarak; tavşandaki 6. haftaya ait sonuçların, insandaki 18. haftaya tekabül ettiği kabul edilmektedir. Tavşan modelinde 6 haftalık sürenin tamamlanmasıyla implantların yüklenmeye karşı direnç sağladığı bildirilmektedir (Misch 1999). Tavşan tibia modeline monokortikal olarak yerleştirilen, kaplanmış yüzeye sahip implantları kendi

aralarında (Reigstad ve ark 2011) veya işlem görmemiş titanyum yüzeye sahip implantlarla, 6. hafta sonundaki yeni kemik oluşum düzeyleri yönüyle değerlendiren çalışmalar mevcuttur (Park ve ark 2007, Suh ve ark 2007, Athraa ve ark 2008).

İmplant çevresi kemik dokusunun ışık mikroskobuyla incelenmesinde, non-kalsifiye histomorfometri yöntemi (Park ve ark 2007) veya dekalsifiye histomorfometri yöntemi (Athraa ve ark 2008, Yamaki ve ark 2012) kullanılabilmektedir.

Athraa ve ark (2008) yaptıkları çalışmada, tavşan tibialarına yerleştirilen YBS 5X kullanılarak 37^0C'de 6 günde elde ettikleri kalsiyum fosfat kaplanan Ti implant ve işlem görmemiş Ti implant yüzeyini histolojik olarak inceleyerek, implant kavitesinde meydana gelen histolojik değişiklikleri incelemişlerdir. Sakrifiye edilen deneklere ait tibia bölgesinin incelenebilmesi amacıyla, implanta beşer milimetre mesafe bırakacak biçimde, blok halinde kemik modelleri elde edilmiştir. Blok halindeki modellerin dekalsifikasyonunu takiben yumuşak hale gelen kemik yapıya ait implant çevresi doku, ikiye ayrılmıştır. Hematoksilen Eosin ve Van Gausian boyaları kullanılarak hazırlanan histolojik kesitlerde, kaplama yüzeyi elde edilen titanyum implantlara ait yüzeyler ışık mikroskobuyla incelenmiştir ve incelenen kesitlerde, yeni kemik oluşumu, kollagen iplikçik yapılar değerlendirilmiştir. İkinci haftada sakrifiye edilen tavşanlarda Ti vida çevresinde yeni oluşan kemik trabeküllerinin vaskularizasyonu yüksek bağ dokusuyla ilişkili olduğu görülmektedir. Kaplanan Ti implant çevresinde ise osteoblastlarla birlikte yeni oluşan trabeküler kemik izlenmektedir. Altıncı haftada sakrifiye edilen tavşanlara ait kesitlerde ise, kemik iliğinde yer alan bölgede seyrek görülen kemik trabeküllerinin, biraraya gelerek yeni kemik yüzeyini oluşturdukları görülmektedir. Bu dönemde, kemik trabeküllerinin birbirleriye daha sıkı ilişki içerisinde olması, aktif kemik formasyonunun devam ettiğini göstermektedir. Ayrıca yüzeyde yer alan yeni kemiğin, havers sistemine sahip olduğu, olgunlaşması tamamlanmamış kompakt kemiğin oluştuğu ve çevreleyen bölgede de lamelli kemiğin bulunduğu gözlenmektedir. Biyomimetik olarak kaplanmış kalsiyum fosfat kristallerinin biyolojik ortamda çözünmesi, bu kristallerin biyouyumlu olması ve kaplanan materyalinin implant yüzeyinde pürüzlü alanlar oluşturabilmesi, bölgedeki hücresel yapılarla kaplama materyali arasında gerçekleşen hücresel etkileşimi

arttırarak daha belirgin hale getirmektedir. İmplant yüzeylerinde yer alan biyomimetik kaplama yüzeyi, kemikteki remodelingi hızlandırmaktadır.

İmplant çevresindeki dokunun histolojik olarak incelendiği, bir başka çalışmada ise, koyunların femur ve tibia diafizlerine yerleştirilen implantların 2. hafta ve 3. aydaki kemik oluşum düzeyleri değerlendirilmektedir (Franchi ve ark 2004). Erken dönem olarak nitelendirilen 2. haftada düzgün yüzeyli Ti vida çevresinde yeni oluşan ince kemik trabeküllerinin vidaya doğru uzandığı görülmektedir. Pürüzlü yüzeye sahip vidalarda ise, oluşan yeni kemiğe ait trabeküllerin daha sık olduğu ve oluşan trabeküler yapı boyunca osteoblastlar izlenmektedir. Koyunlarda implant çevresi dokunun iyileşmesinin tamamlandığı 3. ayda ise vidaların çevresindeki dokuda olgunlaşmış lamelli kemik dokusu ve osteonlar görülmektedir. Erken dönemde vida çevresinde oluşan trabeküler kemik, iyileşmenin ilerleyen dönemlerinde olgunlaşmış kemik dokusunu oluşturmaktadır.

Yaptığımız bu çalışmada, vida çevresi dokunun incelenmesi için yapılan histolojik ve histomorfometrik değerlendirmede, literatürde daha önce kullanılan (Athraa ve ark 2008, Yamaki ve ark 2012), dekalsifiye histomorfometri yöntemi uygulandı. Vida çevresinde oluşan yeni kemik dokusu, osteoid doku, bağ dokusu ve kan damarı alanları Saulacic ve ark (2012) nın tarifllediği gibi belirlenerek, her iki grup için ortalama alan yüzdeleri hesaplandı. Ayrıca her bir preparatta, osteoklast sayıları hesaplanarak her iki grup için ortalama osteoklast sayısı belirlendi.

Buna göre 6. hafta sonunda yapılan histolojik incelemede, vidaları çevreleyen dokularda literatürle uyumlu biçimde, yeni oluşan lamelli kemik dokusu, ince bant halinde fibrokartilaj dokusu ve yeni oluşan kemiğe ait trabeküller görülmektedir. Histomorfometrik değerlendirmede ise oluşan yeni kemik dokusunun ortalama alan yüzdesinin, deney grubunda daha yüksek olduğu tespit edildi. Ancak deney ve kontrol grupları arasında yeni kemik dokusu ortalama alan yüzdesi yönüyle istatistiksel fark görülmemektedir. Osteoid doku ve bağ dokusu ortalama alan yüzdeleri ise kontrol grubunda daha yüksek bulundu Ancak her iki grup arasında belirlenen bu farklar da, istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. Kan damarı ortalama alan yüzdesinin ise deney grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edildi. Deney grubuna ait vida çevresi dokudaki kan damarı

ortalama alan yüzdesinin artışının, sahadaki metabolik faaliyetlerin hızlanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Metabolik faaliyetlerin hızlanması, kalsiyum ve fosfat kristallerinin oluşan yeni kemik dokusuna daha erken dönemde yerleşebilmesine ortam sağlamaktadır. Bu durumun, iyileşme ve yeni kemik oluşum hızını olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir. Mikroskop sahasında görülen osteoklast sayısı ise, deney grubunda ortalama 25 olarak gözlenirken; kontrol grubunda bu sayı 15 olarak gözlenmiştir. Metabolik faaliyetlerin hızlanmasının, kemikteki remodelingin hızlanmasına olumlu yönde katkı sağladığı; osteoklast sayısındaki artışın da, hızlanmış remodeling ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Her iki gruba ait histolojik preparatların hiçbirinde, fibröz doku enkapsülasyonuna ve kemik dokusu yıkımına rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, kalsiyum fosfat kaplanan ve yumurta kabuk zarı proteini adzorbe edilen vidaların, biyouyumlu olduğu, immün reaksiyona ortam oluşturmadığı ve osseointegrasyon düzeyi üzerindeki etkilerinin de olumlu yönde olmakla birlikte, sınırlı olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada YBS 10X solüsyonuyla yapılan biyomimetik kaplamanın kalınlığı yaklaşık 32 ile 48 mikron arasında bulunmuştur. Yapılan analizler sonucunda kalsiyum fosfat tabakasının braşit kristallerinden meydana geldiği gözlenmiştir.

Elde edilen kaplama yüzeyinin, çevre kemik dokuda rezorpsiyona, immün ya da alerjik reaksiyona sebebiyet vermeyen, biyouyumlu bir materyal olduğu gözlenmektedir.

Daha önce kalsiyum fosfat kaplı yüzeye jelatin adzorpsiyonunda uygulanan yöntem, suda eriyebilir yumurta kabuk zarı proteininin de adzorpsiyonunda uygulanabilmektedir (Narbat M ve ark 2006). İşlem esnasında çapraz bağ (crosslinking) oluşturucu ajan olarak kullanılan gluteraldehit kullanılmıştır. Operasyon sahasında gluteraldehite bağlı toksik değişikliklerin gözlenmemesi işlem sırasında crosslinkinge katılmayan gluteraldehitin, hemen hemen tamamının malzemeden uzaklaştırılabildiğini ortaya koymaktadır. Suda eriyebilir yumurta kabuk zarı proteinin çözücüsü olan asetik asit solüsyonu kaplama yüzeyini oluşturan braşit kristallerini çözdüğünden, zar proteini çözdürme işlemi sonrasında çözeltinin pH' sı sodyum bikarbonatla 7,5' e ayarlanmıştır.

Kaplama yüzeyine ilişkin in vitro ortamda planlanmış olan ve materyalin mekanik özelliklerini tanımlayan bir ön çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada titanyum alaşıma sahip vida yüzeyi kaplama yüzeyini taşıyıcı bir materyal olarak kullanılmıştır. Bu tarz çalışmalarda, yerleştirilme esnasında kaplama materyalinin vida yüzeyinden ayrılması sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Bu nedenle vidaların kemiğe yerleştirilmesinde yüzeydeki kaplama materyalini olabildiğince muhafaza edebildiği gözlenen bir yaklaşım uygulanmıştır. Bu sayede primer stabilizasyon sağlanırken; kaplama yüzeyinin çok büyük bir kısmının vida yüzeyinde kalmasına olanak sağlanmıştır.

Mikrotomografik incelemede deney grubunun ortalama trabekül sayısı ve kemik yüzey yoğunluğu istatistiksel olarak önemli düzeyde artış göstermiştir. Kemik yüzey yoğunluğu değeri, trabekül sayısı ve hacminden etkilenen bir parametredir. Kemik gelişiminin devam ettiği bölgelerde daha yüksek kemik yüzey yoğunluğu

değerlerine ulaşılmaktadır. Bu değerin yüksek oluşu, incelenen bölgedeki kemiğin mekanik özelliklerinin olumlu yönde etkilendiğini düşündürmektedir. Grupların diğer mikrotomografik parametreleri arasındaki farklar öneme sahip değildir ($p>0,05$).

Histolojik parametreler incelendiğinde, olumlu yönde fark gözlemlenmeyişinin, braşit kristallerinin ortamdan erken dönemde rezorbe olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Erken dönemdeki rezorpsiyon, materyalin sahip olduğu biyoaktif etkinin, erken dönemde hızlı bir biçimde ortaya çıkmasına ve kısa vadede sonlanmasına ortam oluşturmaktadır. Bu yönüyle incelendiğinde, kaplama materyalinin sağladığı olumlu katkının erken dönemde ortadan kalktığı düşünülmektedir.

Histolojik incelemenin sonunda, deney grubundaki birim alana düşen osteoklast sayısının daha yüksek olduğu gözlemlenmektedir. Bu bulgu da kemikteki remodeling fazının deney grubunda daha hızlı olduğunu düşündürmektedir.

Bu sonuçlar ışığında, biyomimetik kaplama yöntemi vasıtasıyla YBS 10X ile elde edilen kalsiyum fosfat kristalleri ve adzorbe edilen yumurta kabuk zarı proteinin, biyouyumlu bir kompozit materyal olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bu kompozit biyomateryalin, yeni kemik oluşumu üzerindeki olumlu etkilerinin, Ti alaşımdan oluşan vida yüzeylerine ek olarak, çeşitli sentetik biyopolimer yapıların iç ve dış yüzeylerine kaplanmasıyla; sentetik biyopolimerlerin biyoaktif özelliklerine de olumlu yönde katkı sağlayabileceği tahmin edilmektedir. Bu çalışmada elde edilen biyomateryalin, biyoaktif özelliklerine ek olarak, mekanik özellikleri üzerinde de ek çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu tarz bir materyalin, deneysel amaçların dışında, dental implant sistemlerine entegre edilebilmesi için, materyalin mekanik özelliklerinin belirlenmesi ve bu materyalin vidalanma esnasında yüzeyden ayrılmasını olabildiğince azaltabilecek implant yüzeyi tasarımlarına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abe Y, Kokubo T, Yamamuro T, 1990. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. J Mater Sci Mater Med, 1, 4, 233-8.

Aberg J, Brisby H, Henriksson HB, Lindahl A, Thomsen P, Engqvist H, 2010. Premixed acidic calcium phosphate cement: characterization of strength and microstructure. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 93, 2, 436-41.

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI, 1981. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Int J Oral Surg, 10, 6, 387-416.

Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, 2008. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. J Dent Res, 87, 2, 107-18.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, P. W, 2002. The Extracellular Matrix of Animals. In: Molecular Biology of the Cell. 4th edition, New York, Garland Science, Erişim tarihi, 12 Mart 2015. Erişim adresi, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810

Andric T, Sampson AC, Freeman JW, 2011. Fabrication and characterization of electrospun osteon mimicking scaffolds for bone tissue engineering. Mater Sci Eng C, 31, 1, 2-8.

Arias JL, Arias JI, Fernandez MS, 2008. Avian Eggshell as a Template for Biomimetic Synthesis of New Materials. In: Handbook of Biomineralization. Eds: Baurerlein E, Behrens P, Epple M, first edition, Berlin, Wiley, p. 109-17.

Arias JL, Fernandez MS, Dennis JE, Caplan AI, 1991. Collagens of the Chicken Eggshell Membranes. Connect Tissue Res, 26, 1-2, 37-45.

Arias JL, Fink DJ, Xiao S-Q, Heuer AH, Caplan AI, 1993. Biomineralization and Eggshells: Cell-Mediated Acellular Compartments of Mineralized Extracellular Matrix. In: International Review of Cytology. Eds: Kwang WJ, Jonathan J, first edition, California, Academic Press, p. 217-50.

Arias JL, Garcia-Sanz FJ, Mayor MB, Chiussi S, Pou J, Leon B, Perez-Amor M, 1998. Physicochemical properties of calcium phosphate coatings produced by pulsed laser deposition at different water vapour pressures. Biomaterials, 19, 10, 883-8.

Ashraf S, Khalid ZM, Hussain I, 2013. Eggshell membrane-templated porous gold membranes using nanoparticles as building blocks. J Chem Soc Pak, 35, 3, 730-6.

Athraa YA-H, Salim ALS, Ban AA, Thair LA, 2008. Histological evaluation of bone-implant interface associated with biomimetic coated commercially pure titanium and Ti-6Al-7Nb alloy implants. Journal of the college of dentistry 20, 2, 59-66.

Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K, 2004. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. Clin Oral Implants Res, 15, 3, 346-50.

Badami AS, Kreke MR, Thompson MS, Riffle JS, Goldstein AS, 2006. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. Biomaterials, 27, 4, 596-606.

Bailey J, Ollis DF, 1986. Biochemical Engineering Fundamentals, Second ed. McGraw-Hill Chemical Engineering Series, Singapore, McGraw-Hill p. 76-79.

Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P, 2003b. In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants. J Biomed Mater Res A, 64, 2, 378-87.

Barrere F, van der Valk CM, Meijer G, Dalmeijer RA, de Groot K, Layrolle P, 2003a. Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 67, 1, 655-65.

Bcube 2015a. Micro computed tomography history. Erişim tarihi 03 Mart 2015. Erişim adresi, http://www.b-cube.ch/index.php?option=com_content&view=article&id=21&Itemid=19

Bcube 2015b. Morphometric parameters. Erişim tarihi 03 Mart 2015. Erişim adresi, http://www.bcube.ch/?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=20

Benson KF, Ruff KJ, Jensen GS, 2012. Effects of natural eggshell membrane (NEM) on cytokine production in cultures of peripheral blood mononuclear cells: increased suppression of tumor necrosis factor-alpha levels after in vitro digestion. J Med Food, 15, 4, 360-8.

Bergmans L, Van Cleynenbreugel J, Wevers M, Lambrechts P, 2001. A methodology for quantitative evaluation of root canal instrumentation using microcomputed tomography. Int Endod J, 34, 5, 390-8.

Bermúdez O, Boltong MG, Driessens FCM, Planell JA, 1994. Development of some calcium phosphate cements from combinations of α-TCP, MCPM and CaO. J Mater Sci Mater Med, 5, 3, 160-3.

Bernstein A, Nobel D, Mayr HO, Berger G, Gildenhaar R, Brandt J, 2008. Histological and histomorphometric investigations on bone integration of rapidly resorbable calcium phosphate ceramics. J.Biomed.Mater.Res.B.Appl Biomater, 84, 2, 452-62.

Bhattacharjee T, Khan A, Maru G, Ingle A, Krishna CM, 2015. A preliminary Raman spectroscopic study of urine: diagnosis of breast cancer in animal models. Analyst, 140, 2, 456-66.

Biemond JE, Eufrasio TS, Hannink G, Verdonschot N, Buma P, 2011. Assessment of bone ingrowth potential of biomimetic hydroxyapatite and brushite coated porous E-beam structures. J Mater Sci Mater Med, 22, 4, 917-25.

Blind O, Klein LH, Dailey B, Jordan L, 2005. Characterization of hydroxyapatite films obtained by pulsed-laser deposition on Ti and Ti-6AL-4v substrates. Dent Mater, 21, 11, 1017-24.

Block MS, Kent JN, Kay JF, 1987. Evaluation of hydroxylapatite-coated titanium dental implants in dogs. J Oral Maxillofac Surg, 45, 7, 601-7.

Bohner M, Gbureck U, 2008. Thermal reactions of brushite cements. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 84, 2, 375-85.

Bonfield W, Grynpas MD, Tully AE, Bowman J, Abram J, 1981. Hydroxyapatite reinforced polyethylene a mechanically compatible implant material for bone replacement. Biomaterials, 2, 3, 185-6.

Boyd A, Rutledge L, Randolph LD, Mutreja I, Meenan BJ, 2015. The deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings. J Mater Sci Mater Med, 26, 2, 1-14.

Boyd SK, 2009. Micro computed tomography, In: Advange Imaging in Biology and Medicine, Ed: Sensen CW, Hallgrimsson B, first edition, Berlin, Springer, p.3-27.

Brady G, Vaccari J, Clauser H, 1996. Materials Handbook 14th ed New York: McGraw Hill; 1038 p.

Bradbury P, Gordon KC, 1990. Connective tissues and stains. In: The Theory and Practice of Histological Techniques. Eds: Bancroft JD, Stewens A,3rd ed. Avon, The Bath Press, p. 119–142.

Branemark PI, 1959. Vital microscopy of bone marrow in rabbit. Scand J Clin Lab Invest, 11 Supp 38, 1-82.

Branemark PI, 1983. Osseointegration and its experimental background. J Prosthet Dent, 50, 3, 399-410.

Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A, 1969. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg, 3, 2, 81-100.

Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, Ohman A, 1977. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand J Plast Reconstr Surg Suppl, 16, 1-132.

Brohede U, Forsgren J, Roos S, Mihranyan A, Engqvist H, Stromme M, 2009. Multifunctional implant coatings providing possibilities for fast antibiotics loading with subsequent slow release. J Mater Sci Mater Med, 20, 9, 1859-67.

Bruker Micro CT 2015. Morphometric parameters measured by Skyscan™ CT-analyser software, Erişim tarihi 10 Mart 2015. Erişim adresi, http://www.skyscan.be/next/ctan03.pdf

Brunel G, Brocard D, Duffort JF, Jacquet E, Justumus P, Simonet T, Benque E, 2001. Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases. J Periodontol, 72, 2, 257-64.

Brunski JB, Moccia AF, Jr., Pollack SR, Korostoff E, Trachtenberg DI, 1979. The influence of functional use of endosseous dental implants on the tissue-implant interface. I. Histological aspects. J Dent Res, 58, 10, 1953-69.

Bumgardner JD, Boring JG, Cooper RC, Jr., Gao C, Givaruangsawat S, Gilbert JA, Misch CM, Steflik DE, 2000. Preliminary evaluation of a new dental implant design in canine models. Implant Dent, 9, 3, 252-60.

Bumgardner JD, Chesnutt BM, Yuan Y, Yang Y, Appleford M, Oh S, McLaughlin R, Elder SH, Ong JL, 2007. The integration of chitosan-coated titanium in bone: an in vivo study in rabbits. Implant Dent, 16, 1, 66-79.

Bunker BC, Rieke PC, Tarasevich BJ, Campbell AA, Fryxell GE, Graff GL, Song L, Liu J, Virden JW, McVay GL, 1994. Ceramic thin-film formation on functionalized interfaces through biomimetic processing. Science, 264, 5155, 48-55.

Burghardt AJ, Link TM, Majumdar S, 2011. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. Clin Orthop Relat Res, 469, 8, 2179-93.

Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG, 2004. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. J Dent Res, 83, 7, 529-33.

Butz F, Ogawa T, Chang TL, Nishimura I, 2006. Three-dimensional bone-implant integration profiling using micro-computed tomography. Int J Oral Maxillofac Implants, 21, 5, 687-95.

Cai YD, Wang SM, Chou AH, Yu LY, Sun J, 2012. Zinc-coated carbonate apatite derived from avian eggshell for potential use as bone substitute. Part I: preparation and properties. Implant Dent, 21, 3, 230-5.

Cao Y, Weng J, Chen J, Feng J, Yang Z, Zhang X, 1996. Water vapour-treated hydroxyapatite coatings after plasma spraying and their characteristics. Biomaterials, 17, 4, 419-24.

Carey LE, Xu HHK, Simon CG, Takagi S, Chow LC, 2005. Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. Biomaterials, 26, 24, 5002-14.

Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, 1988. Implant fixation improved by close fit. Cylindrical implant-bone interface studied in rabbits. Acta Orthop Scand, 59, 3, 272-5.

Carrino DA, Dennis JE, Wu TM, Arias JL, Fernandez MS, Rodriguez JP, Fink DJ, Heuer AH, Caplan AI, 1996. The avian eggshell extracellular matrix as a model for biomineralization. Connect Tissue Res, 35, 1-4, 325-9.

Cartmell S, 2009. Controlled release scaffolds for bone tissue engineering. Journal of pharmaceutical sciences, 98, 2, 430-41.

Castaneda S, Largo R, Calvo E, Rodriguez-Salvanes F, Marcos ME, Diaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G, 2006. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. Skeletal radiology, 35, 1, 34-41.

Chai H, Guo L, Wang X, Gao X, Liu K, Fu Y, Guan J, Tan L, Yang K, 2012. In vitro and in vivo evaluations on osteogenesis and biodegradability of a beta-tricalcium phosphate coated magnesium alloy. J Biomed Mater Res A, 100, 2, 293-304.

Chai Z, Li Y, Liu F, Du B, Jiao T, Zhang C, Leng X, 2013. Outer eggshell membrane as delivery vehicle for polysaccharide/protein microcapsules incorporated with vitamin E. J Agric Food Chem, 61, 3, 589-95.

Chappard C, Marchadier A, Benhamou L, 2008. Interindividual and intraspecimen variability of 3-D bone microarchitectural parameters in iliac crest biopsies imaged by conventional micro-computed tomography. Journal of bone and mineral metabolism, 26, 5, 506-13.

Chee WW, 2005. Treatment planning: implant-supported partial overdentures. Journal of the California Dental Association, 33, 4, 313-6.

Cheifetz S, Li IW, McCulloch CA, Sampath K, Sodek J, 1996. Influence of osteogenic protein-1 (OP-1;BMP-7) and transforming growth factor-beta 1 on bone formation in vitro. Connect Tissue Res, 35, 1-4, 71-8.

Chemtube3d, 2015. Hydroxyapatite crystal structure, Erişim tarihi 23 Ocak 2015. Erişim adresi, http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm.

Chen D, Bertollo N, Lau A, Taki N, Nishino T, Mishima H, Kawamura H, Walsh WR, 2011. Osseointegration of porous titanium implants with and without electrochemically deposited DCPD coating in an ovine model. J Orthop Surg Res, 6, 56.

Chen Y, Mak AFT, Wang M, Li J, Wong MS, 2006. PLLA scaffolds with biomimetic apatite coating and biomimetic apatite/collagen composite coating to enhance osteoblast-like cells attachment and activity. Surf Coat Technol, 201, 3–4, 575-80.

Chen Y, Miao X, 2005. Thermal and chemical stability of fluorohydroxyapatite ceramics with different fluorine contents. Biomaterials, 26, 11, 1205-10.

Chou CW, 1982. Pathological studies on calcification of the intervertebral discs. Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 56, 4, 331-45.

Choudhary P, Tandon S, Ganesh M, Mehra A, 2012. Evaluation of the remineralization potential of amorphous calcium phosphate and fluoride containing pit and fissure sealants using scanning electron microscopy. Indian J Dent Res, 23, 2, 157-63.

Chow L, 2001. Solubility of calcium phosphates. Monogr Oral Sci, 18, 94-111.

Chug A, Shukla S, Mahesh L, Jadwani S, 2013. Osseointegration—Molecular events at the bone–implant interface: A review. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol, 25, 1, 1-4.

Clèries L, Fernández-Pradas JM, Sardin G, Morenza JL, 1998. Dissolution behaviour of calcium phosphate coatings obtained by laser ablation. Biomaterials, 19, 16, 1483-7.

Clèries L, Fernández–Pradas JM, Morenza JL, 2000. Bone growth on and resorption of calcium phosphate coatings obtained by pulsed laser deposition. J Biomed Mater Res, 49, 1, 43-52.

Cook SD, Kay JF, Thomas KA, Jarcho M, 1987. Interface mechanics and histology of titanium and hydroxylapatite-coated titanium for dental implant applications. Int J Oral Maxillofac Implants, 2, 1, 15-22.

Crane NJ, Popescu V, Morris MD, Steenhuis P, Ignelzi MA, Jr., 2006. Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. Bone, 39, 3, 434-42.

Culling CFA, Allison RT, Barr WT, 1985. Cellular Pathology Technique. Fourth ed. Butterworths and Co Ltd London, p. 408-30.

Daculsi G, LeGeros RZ, Jean A, Kerebel B, 1987. Possible physico-chemical processes in human dentin caries. J Dent Res, 66, 8, 1356-9.

Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B, 1989. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. J Biomed Mater Res, 23, 8, 883-94.

de Groot K, Geesink R, Klein CP, Serekian P, 1987. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. J Biomed Mater Res, 21, 12, 1375-81.

de Groot K, Wolke JG, Jansen JA, 1998. Calcium phosphate coatings for medical implants. Proc Inst Mech Eng H, 212, 2, 137-47.

dePutter C, deLange GL, deGroot K. Permucosal oral implants of dense hydroxyapatite fixation in alveolar bone. Int. Congress on Tissue Integration in Oral and Maxillofacial Rec. Abstract book: p. 389-94, 1986 Amsterdam, Holland.

Dennis JE, Xiao S-Q, Agarwal M, Fink DJ, Heuer AH, Caplan AI, 1996. Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from White Leghorn chickens (Gallus gallus). Journal of Morphology, 228, 3, 287-306.

Denissen HW, Verdhuis AAh, Van der Hooff A. Hydroxylapatite titanium implants, Int Congress on Tissue Integration in Oral Maxillofacial Rec. Abstract book: p. 372-89 1986 Amsterdam, Holland.

Dhert WJA, Thomsen P, Klein CPAT, De Groot K, Rozing PM, Ericson LE, 1994. Fluorapatite-coated implants in experimental arthritis: the response of rabbit trabecular bone. J Mater Sci Mater Med, 5, 2, 59-66.

Diekwisch TG, Berman BJ, Gentner S, Slavkin HC, 1995. Initial enamel crystals are not spatially associated with mineralized dentine. Cell Tissue Res, 279, 1, 149-67.

Dinda GP, Shin J, Mazumder J, 2009. Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films on Ti-6Al-4V: effect of heat treatment on structure and properties. Acta Biomater, 5, 5, 1821-30.

Ding M, Odgaard A, Linde F, Hvid I, 2002. Age-related variations in the microstructure of human tibial cancellous bone. J Orthop Res, 20, 3, 615-21.

Dorozhkin S, 2009. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. Materials, 2, 2, 399-498.

Dorozhkin SV, Epple M, 2002. Biological and medical significance of calcium phosphates. Angew Chem Int Ed Engl, 41, 17, 3130-46.

Driessens FC, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP, 1998. Osteotransductive bone cements. Proc Inst Mech Eng H, 212, 6, 427-35.

Drummond GN, Scholl RA, (1998). Enhanced reactive DC sputtering system, Google Patents.

Ducheyne P, Radin S, King L, 1993. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. J Biomed Mater Res, 27, 1, 25-34.

Dupoirieux L, Pourquier D, Neves M, Teot L, 2001. Resorption kinetics of eggshell: an in vivo study. J Craniofac Surg, 12, 1, 53-8.

Duque G, Rivas D, Li W, Li A, Henderson JE, Ferland G, Gaudreau P, 2009. Age-related bone loss in the LOU/c rat model of healthy ageing. Exp gerontol, 44, 3, 183-9.

Durmus E, Celik I, Ozturk A, Ozkan Y, Aydin MF, 2003. Evaluation of the potential beneficial effects of ostrich eggshell combined with eggshell membranes in healing of cranial defects in rabbits. J Int Med Res, 31, 3, 223-30.

Elliot JC 1994. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. First Ed. Amsterdam, Elsevier Science BV, p. 125-8.

Engelke K, Libanati C, Fuerst T, Zysset P, Genant HK, 2013. Advanced CT based In Vivo Methods for the Assessment of Bone Density, Structure, and Strength. Curr Osteoporos Rep, 11, 3, 246-55.

Escudero A, Calvo ME, Rivera-Fernández S, de la Fuente JM, Ocaña M, 2013. Microwave-Assisted Synthesis of Biocompatible Europium-Doped Calcium Hydroxyapatite and Fluoroapatite Luminescent Nanospindles Functionalized with Poly(acrylic acid). Langmuir, 29, 6, 1985-94.

Fang L, Ding X, Wang HM, Zhu XH, 2014. Chronological changes in the microstructure of bone during peri-implant healing: a microcomputed tomographic evaluation. Br J Oral Maxillofac Surg, 52, 9, 816-21.

Farjah GH, Heshmatian B, Karimipour M, Saberi A, 2013. Using eggshell membrane as nerve guide channels in peripheral nerve regeneration. Iran J Basic Med Sci, 16, 8, 901-5.

Fatehii K, Moztarzadeh F, Solati-Hashjin M, Tahriri M, Rezvannia M, 2009. Biomimetic hydroxyapatite coatings deposited onto heat and alkali treated Ti6Al4V surface. Surf Eng, 25, 8, 583-8.

Feddes B, González P, Serra J, Pou J, Chiussi S, Wolke JC, Jäger C, 2009. Characterization of Thin Calcium Phosphate Coating. In: Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. Eds: León B, Jansen J, first edition, New York, Springer, p. 25-66.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M, 1989. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. J Bone Miner Res, 4, 1, 3-11.

Feng QL, Zhu X, Li HD, Kim TN, 2001. Crystal orientation regulation in ostrich eggshells. J Cryst Growth, 233, 3, 548-54.

Fernández-Pradas JM, Clèries L, Martínez E, Sardin G, Esteve J, Morenza JL, 2001. Influence of thickness on the properties of hydroxyapatite coatings deposited by KrF laser ablation. Biomaterials, 22, 15, 2171-5.

Fernández-Pradas JM, Clèries L, Sardin G, Morenza JL, 2002. Characterization of calcium phosphate coatings deposited by Nd:YAG laser ablation at 355 nm: influence of thickness. Biomaterials, 23, 9, 1989-94.

Ferreira A, Oliveira C, Rocha F, 2003. The different phases in the precipitation of dicalcium phosphate dihydrate. J Cryst Growth, 252, 4, 599-611.

Filiaggi MJ, Coombs NA, Pilliar RM, 1991. Characterization of the interface in the plasma-sprayed HA coating/Ti-6Al-4V implant system. J Biomed Mater Res, 25, 10, 1211-29.

Francis CS, Wong RK, Cohen SR, 2012. Endoscopic delivery of calcium phosphate cement for secondary craniofacial reconstruction. J Craniofac Surg, 23, 7 Suppl 1, 2057-60.

Friess W, 1998. Collagen--biomaterial for drug delivery. Eur J Pharm Biopharm, 45, 2, 113-36.

Frost H, 1969. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. Calc. Tis Res., 3, 1, 211-37.

Gaffar A, Blake-Haskins J, Mellberg J, 1993. In vivo studies with a dicalcium phosphate dihydrate/MFP system for caries prevention. Int Dent J, 43, 1 Suppl 1, 81-8.

Gao Y, Hu J, Guan TH, Wu J, Zhang CB, Gao B, 2014. Physical properties and cellular responses to calcium phosphate coating produced by laser rapid forming on titanium. Lasers Med Sci, 29, 1, 9-17.

Gardiner D, 1989. Introduction to Raman Scattering. In: Practical Raman Spectroscopy. Eds: Gardiner D, Graves P, first edition, Berlin Heidelberg, Springer, p. 1-12.

Garetto LP, Chen J, Parr JA, Roberts WE, 1995. Remodeling dynamics of bone supporting rigidly fixed titanium implants: a histomorphometric comparison in four species including humans. Implant Dent, 4, 4, 235-43.

Gawoski JM, Balogh K, Landis WJ, 1985. Aortic valvular tophus: identification by X-ray diffraction of urate and calcium phosphates. J Clin Pathol, 38, 8, 873-6.

Gill BJ, Tucker RC, 1986. Plasma spray coating processes. Materials Science and Technology, 2, 3, 207-13.

Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI, 1988. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. Am J Physiol, 255, 4 Pt 1, E416-21.

Gitelman SE, Kirk M, Ye JQ, Filvaroff EH, Kahn AJ, Derynck R, 1995. Vgr-1/BMP-6 induces osteoblastic differentiation of pluripotential mesenchymal cells. Cell Growth Differ, 6, 7, 827-36.

Glatt V, Canalis E, Stadmeyer L, Bouxsein ML, 2007. Age-related changes in trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice. J Bone Miner Res, 22, 8, 1197-207.

Golec TS, Krauser JT, 1992. Long-term retrospective studies on hydroxyapatite coated endosteal and subperiosteal implants. Dent Clin North Am, 36, 1, 39-65.

Goto T, Sasaki K, 2014. Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination. Ceram Int, 40, 7, Part B, 10777-85.

Gross U, Brandes J, Strunz V, Bab I, Sela J, 1981. The ultrastructure of the interface between a glass ceramic and bone. J Biomed Mater Res, 15, 3, 291-305.

Guilleminet M, Judet R, 2014. Acrylic prostheses in surgery of the hip. Orthop Traumatol Surg Res, 100, 1, 5-14.

Guldberg RE, Lin AS, Coleman R, Robertson G, Duvall C, 2004. Microcomputed tomography imaging of skeletal development and growth. Birth Defects Res C Embryo Today, 72, 3, 250-9.

Guo H, Su J, Wei J, Kong H, Liu C, 2009. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. Acta Biomater, 5, 1, 268-78.

Habibovic P, Barrère F, Van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P, 2002. Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants. J Am Ceram Soc, 85, 3, 517-22.

Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE, 2008. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. Biomaterials, 29, 7, 944-53.

Habibovic P, Li J, van der Valk CM, Meijer G, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Groot K, 2005. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. Biomaterials, 26, 1, 23-36.

Hammad SM, El Banna MS, Elsaka SE, 2013. Twelve-month bracket failure rate with amorphous calcium phosphate bonding system. Eur J Orthod, 35, 5, 622-7.

Hanawa T, Ota M, 1992. Characterization of surface film formed on titanium in electrolyte using XPS. Appl Surf Sci, 55, 4, 269-76.

Hani H, Allaudin ZN, Tengku Ibrahim TA, Mohd-Lila MA, Sarsaifi K, Camalxaman SN, Othman AM, 2014. Morphological changes of post-isolation of caprine pancreatic islet. In vitro cellular & developmental biology. Animal, 51, 2, 113-20.

Hayakawa T, Yoshinari M, Kiba H, Yamamoto H, Nemoto K, Jansen JA, 2002. Trabecular bone response to surface roughened and calcium phosphate coated titanium implants. Biomaterials, 23, 4, 1025-31.

He F, Yang G, Wang X, Zhao S, 2009. Bone responses to rough titanium implants coated with biomimetic Ca-P in rabbit tibia. J Biomed Mater Res. B, Appl Biomater, 90, 2, 857-63.

Hench LL, 1991. Bioceramics: From Concept to Clinic. J Am Ceram Soc, 74, 7, 1487-510.

Hench LL, Best SM, 2013. Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics: Basic Principles. In: Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Eds: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, 3th ed. Oxford: Academic Press, p. 138.

Herman H, 1988. Plasma Spray Deposition Processes. MRS Bull, 13, 12, 60-7.

Herrera A, Mateo J, Lobo-Escolar A, Panisello JJ, Ibarz E, Gracia L, 2013. Long-term outcomes of a new model of anatomical hydroxyapatite-coated hip prosthesis. J Arthroplasty, 28, 7, 1160-6.

Hildebrand T, Rüegsegger P, 1997. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. J Microsc, 185, 1, 67-75.

Hincke MT, Nys Y, Gautron J, 2010. The Role of Matrix Proteins in Eggshell Formation. The Journal of Poultry Science, 47, 3, 208-19.

Hofmann MP, Mohammed AR, Perrie Y, Gbureck U, Barralet JE, 2009. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities. Acta Biomater, 5, 1, 43-9.

Hosaka M, Shibata Y, Miyazaki T, 2006. Preliminary beta-tricalcium phosphate coating prepared by discharging in a modified body fluid enhances collagen immobilization onto titanium. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 78, 2, 237-42.

Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JI, Baylink DJ, 1981. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. Proc Natl Acad Sci USA, 78, 5, 3204-8.

Imaizumi H, Sakurai M, Kashimoto O, Kikawa T, Suzuki O, 2006. Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. Calcif Tissue Int, 78, 1, 45-54.

Ino T, Hattori M, Yoshida T, Hattori S, Yoshimura K, Takahashi K, 2006. Improved physical and biochemical features of a collagen membrane by conjugating with soluble egg shell membrane protein. Biosci Biotechnol Biochem, 70, 4, 865-73.

Ishikawa S-i, Suyama K, Arihara K, Itoh M, 2002. Uptake and recovery of gold ions from electroplating wastes using eggshell membrane. Bioresour Technol, 81, 3, 201-6.

Jalota S, Tas AC, Bhaduri SB, 2005. Synthesis of HA-Seeded TTCP ($Ca_4(PO_4)_2O$) Powders at 1230°C from $Ca(CH_3COO)_2{\cdot}H_2O$ and $NH_4H_2PO_4$. J Am Ceram Soc, 88, 12, 3353-60.

James RA, 1987. Oral İmplants, In: Textbook of practical oral and maxillofacial surgery, Ed: Waite DE, first edition, Texas, Lea & Febiger, p.

Jansen JA, Leon B, 2009. Thin calcium phosphate coatings for medical implants, first edition, New York, Springer, p.

Jayasuriya AC, Shah C, Ebraheim NA, Jayatissa AH, 2008. Acceleration of biomimetic mineralization to apply in bone regeneration. Biomed Mater, 3, 1, 015003.

Jia J, Duan YY, Yu J, Lu JW, 2008. Preparation and immobilization of soluble eggshell membrane protein on the electrospun nanofibers to enhance cell adhesion and growth. J Biomed Mater Res A, 86, 2, 364-73.

Jia J, Liu G, Guo Z-X, Yu J, Duan Y, 2012. Preparation and Characterization of Soluble Eggshell Membrane Protein/PLGA Electrospun Nanofibers for Guided Tissue Regeneration Membrane. Journal of Nanomaterials, 2012, 7.

Jokic B, Jankovic-Castvan I, Veljovic D, Bucevac D, Obradovic-Djuricic K, Petrovic R, DJ J, 2007. Synthesis and settings behavior of alpha-TCP from calcium deficient hyroxyapatite obtained by hydrothermal method. J Optoelectron Adv Mater 2007, 9, 6, 1904–10.

Joschek S, Nies B, Krotz R, Goferich A, 2000. Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. Biomaterials, 21, 16, 1645-58.

Kagel EM, Majeska RJ, Einhorn TA, 1995. Effects of diabetes and steroids on fracture healing. Curr Opin Orthop, 6, 5, 7-13.

Kajiwara H, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Iyama S, Atsuta I, Kido MA, Tanaka T, 2005. The bisphosphonate pamidronate on the surface of titanium stimulates bone formation around tibial implants in rats. Biomaterials, 26, 6, 581-7.

Kamakura S, Sasano Y, Nakamura M, Suzuki O, Ohki H, Kagayama M, Motegi K, 1996. Initiation of alveolar ridge augmentation in the rat mandible by subperiosteal implantation of octacalcium phosphate. Arch Oral Biol, 41, 11, 1029-38.

Kamitakahara M, Imai R, Ioku K, 2013. Preparation and evaluation of spherical Ca-deficient hydroxyapatite granules with controlled surface microstructure as drug carriers. Mater Sci Eng C, 33, 4, 2446-50.

Kamitakahara M, Ohtsuki C, Inada H, Tanihara M, Miyazaki T, 2006. Effect of ZnO addition on bioactive CaO-SiO2-P2O5-CaF2 glass-ceramics containing apatite and wollastonite. Acta Biomater, 2, 4, 467-71.

Kang BJ, Ha YC, Ham DW, Hwang SC, Lee YK, Koo KH, 2014. Third-Generation Alumina-on-Alumina Total Hip Arthroplasty: 14 to 16-Year Follow-Up Study. J Arthroplasty, 30, 3, 411-5.

Kang HW, Tabata Y, Ikada Y, 1999. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials, 20, 14, 1339-44.

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD, 1996. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. Crit Rev Oral Biol Med, 7, 4, 329-45.

Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL, 2001. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. J Biomed Mater Res, 57, 2, 258-67.

Kim C, Kendall MR, Miller MA, Long CL, Larson PR, Humphrey MB, Madden AS, Tas AC, 2013. Comparison of titanium soaked in 5 M NaOH or 5 M KOH solutions. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 33, 1, 327-39.

Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T, 1996. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. J Biomed Mater Res, 32, 3, 409-17.

Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T, 1997. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. J Mater Sci Mater Med, 8, 6, 341-7.

Kim S, Yun Y, Suh D, Kim Y, Park K, Kwon Y-D, Suh J-H, Chung J-Y, Lee D-W, 2012. Recombinant human bone morphogenic protein-2 immobilization onto the surface of apatite-coated titanium significantly promotes osteoblast function and mineralization. Tissue Eng Regen Med, 9, 4, 216-23.

Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Oka M, 1995. Transmission electron microscopy observations at the interface of bone and four types of calcium phosphate ceramics with different calcium/phosphorus molar ratios. Biomaterials, 16, 14, 1101-7.

Klein CP, de Blieck-Hogemrst JM, Wolket JG, de Groot K, 1990. Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. Biomaterials, 11, 7, 509-12.

Klein CP, de Groot K, Drissen AA, van der Lubbe HB, 1985. Interaction of biodegradable β-whitlockite ceramics with bone tissue: An in vivo study. Biomaterials, 6, 3, 189-92.

Knight TA, Payne RG, 2013. Characterization of a PGA-based scaffold for use in a tissue-engineered neo-urinary conduit. Methods Mol Biol, 1001, 179-88.

Kodaka T, Hirayama A, Miake K, Higashi S, 1989. Bacillus-shaped deposits composed of hexahedrally based crystals in human dental calculus. Scanning Microsc, 3, 3, 843-53; discussion 53-4.

Kodaka T, Miake K, 1991. Inorganic components and the fine structures of marginal and deep subgingival calculus attached to human teeth. The Bulletin of Tokyo Dental College, 32, 3, 99-110.

Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T, 1990. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. J Biomed Mater Res, 24, 6, 721-34.

Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, Nagai N, Dohi Y, Ohgushi H, 1998. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. J Biomed Mater Res, 39, 2, 190-9.

Kung FC, Lin CC, Lai WF, 2014. Osteogenesis of human adipose-derived stem cells on hydroxyapatite-mineralized poly(lactic acid) nanofiber sheets. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 45, 578-88.

Laghios CD, Benson BW, Gutmann JL, Cutler CW, 2000. Comparative radiopacity of tetracalcium phosphate and other root-end filling materials. Int Endod J, 33, 4, 311-5.

Lakshminarayanan R, Kini RM, Valiyaveettil S, 2002. Investigation of the role of ansocalcin in the biomineralization in goose eggshell matrix. Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 8, 5155-9.

Lausmaa J, 2001. Mechanical, thermal, chemical and electrochemical surface treatment of titanium. In: Titanium in medicine. Eds: Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, first edition, Berlin, Springer, p. 231-66.

Lavkova J, Khalakhan I, Chundak M, Vorokhta M, Potin V, Matolin V, Matolinova I, 2015. Growth and composition of nanostructured and nanoporous cerium oxide thin films on a graphite foil. Nanoscale, **7**, 4038-47.

Layrolle P, Daculsi G, 2009. Physicochemistry of Apatite and Its Related Calcium Phosphates. In: Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. Eds: León B, Jansen J, first edition, New York, Springer, p. 19-21.

Lee BA, Kim HJ, Xuan YZ, Park YJ, Chung HJ, Kim YJ, 2014a. Osteoblastic behavior to zirconium coating on Ti-6Al-4V alloy. J Adv Prosthodont, 6, 6, 512-20.

Lee DD, Landis WJ, Glimcher MJ, 1986. The solid, calcium-phosphate mineral phases in embryonic chick bone characterized by high-voltage electron diffraction. J Bone Miner Res, 1, 5, 425-32.

Lee S-M, Grass G, Kim G-M, Dresbach C, Zhang L, Gosele U, Knez M, 2009. Low-temperature ZnO atomic layer deposition on biotemplates: flexible photocatalytic ZnO structures from eggshell membranes. Phys Chem Chem Phys, 11, 19, 3608-14.

Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Schoonman J, Jansen JA, 2004. Influence of precursor solution parameters on chemical properties of calcium phosphate coatings prepared using Electrostatic Spray Deposition (ESD). Biomaterials, 25, 4, 641-9.

Leeuwenburgh SG, Wolke JC, Siebers M, Schoonman J, Jansen J, 2009. Electrosprayed Calcium Phosphate Coating for Biomedical Purposes. In: Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. Eds: León B, Jansen J, first edition, New York, Springer, p. 263-300.

LeGeros R, 1985. Preparation of octacalcium phosphate (OCP): A direct fast method. Calcif Tissue Int, 37, 2, 194-7.

LeGeros RZ, 2002. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res, 395, 81-98.

LeGeros RZ, Lee D, Quirolgico G, Shirra WP, Reich L, 1983. In vitro formation of dicalcium phosphate dihydrate, CaHPO4 . 2H2O (DCPD). Scan Electron Microsc, Pt 1, 407-18.

Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, Duquenne M, Krebs S, Rohmer V, Basle MF, Audran M, 2000. Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. J Bone Miner Res, 15, 1, 13-9.

Lehr JR, Brown WE, Brown EH, 1959. Chemical Behavior of Monocalcium Phosphate Monohydrate in Soils1. Soil Sci. Soc. Am. J., 23, 1, 3-7.

León B, 2009. Pulsed Laser Deposition of Thin Calcium Phosphate Coatings. In: Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. Eds: León B, Jansen J, first edition, New York, Springer, p. 101-55.

Leonor I, B. and Azevedo, H. S. and Alves, M. C, Reis RL, 2005. Biomimetic Coatings, Proteins and Biocatalysts: a New Approach to Tailor the Properties of Biodegradable Polymer. In: Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Eds. Reis RL, Roman JS, first edition, Florida, CRC Pres, p. 223-50.

Levitt SR, Crayton PH, Monroe EA, Condrate RA, 1969. Forming method for apatite prostheses. J Biomed Mater Res, 3, 4, 683-4.

Li Q, Guo Z, 2007. Soluble eggshell mebrane protein: Antibacterial property and biodegradability. Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed., 22, 1, 117-9.

Li RH, Wozney JM, 2001. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. Trends Biotechnol, 19, 7, 255-65.

Li X, Xie J, Yuan X, Xia Y, 2008. Coating electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibers with gelatin and calcium phosphate and their use as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. Langmuir, 24, 24, 14145-50.

Li Y, Youdelis WV, Chao BS, Yamauchi H, 1993. Effect of substrate temperature on the orientations of radio frequency sputtered $Ba_2Si_2TiO_8$ thin films. J Vac Sci Technol A, 11, 5, 2771-7.

Liao D, Zheng W, Li X, Yang Q, Yue X, Guo L, Zeng G, 2010. Removal of lead(II) from aqueous solutions using carbonate hydroxyapatite extracted from eggshell waste. J Hazard Mater, 177, 1-3, 126-30.

Lin A, Wang CJ, Kelly J, Gubbi P, Nishimura I, 2009. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. Int J Oral Maxillofac Implants, 24, 5, 808-16.

Lin CC, Fu SJ, Lin YC, Yang IK, Gu Y, 2014. Chitosan-coated electrospun PLA fibers for rapid mineralization of calcium phosphate. Int J Biol Macromol, 68, 39-47.

Liong J, Frank J, Bailey S, 1997. Visualization of eggshell membranes and their interaction with Salmonella enteritidis using confocal scanning laser microscopy. J Food Prot, 60, 9, 1022-8.

Liou S-C, Chen S-Y, 2002. Transformation mechanism of different chemically precipitated apatitic precursors into β-tricalcium phosphate upon calcination. Biomaterials, 23, 23, 4541-7.

Liu T-Y, Chen S-Y, Liu D-M, Liou S-C, 2005. On the study of BSA-loaded calcium-deficient hydroxyapatite nano-carriers for controlled drug delivery. J Control Release, 107, 1, 112-21.

Liu W, Wu H, Li B, Dong C, Choi MMF, Shuang S, 2013. Immobilization of platinum nanoparticles and glucose oxidase on eggshell membrane for glucose detection. Analytical Methods, 5, 19, 5154-60.

Liu Y, de Groot K, Hunziker EB, 2005. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. Bone, 36, 5, 745-57.

Liu Y, Hunziker E, 2009. Biomimetic Coatings and Their Biological Functionalization. In: Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. Eds: León B, Jansen J, first edition, New York, Springer, p. 301-14.

Liu Y, Hunziker E, Van de Vaal C, De Groot K, 2004. Biomimetic coatings vs. collagen sponges as a carrier for BMP-2: a comparison of the osteogenic responses triggered in vivo using an ectopic rat model. Key Engineering Materials, 254, 619-22.

Liu Y, Hunziker EB, Layrolle P, Van Blitterswijk C, Calvert PD, de Groot K, 2003a. Remineralization of demineralized albumin-calcium phosphate coatings. J Biomed Mater Res A, 67, 4, 1155-62.

Liu Y, Hunziker EB, Randall NX, de Groot K, Layrolle P, 2003b. Proteins incorporated into biomimetically prepared calcium phosphate coatings modulate their mechanical strength and dissolution rate. Biomaterials, 24, 1, 65-70.

Liu Y, Wu G, de Groot K, 2010. Biomimetic coatings for bone tissue engineering of critical-sized defects. J R Soc Interface, 7, Suppl 5, 631-S47.

Long FD, Adams RG, DeVore DP, (2005). Preparation of hyaluronic acid from eggshell membrane, Google Patents US 6946551.

Lopez-Heredia MA, Weiss P, Layrolle P, 2007. An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy. J Mater Sci Mater Med, 18, 2, 381-90.

Loudon R, 1964. The Raman effect in crystals. Advances in Physics, 13, 52, 423-82.

Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust J-P, 2002. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. J Biomed Mater Res, 63, 4, 408-12.

Lu JW, Li Q, Qi QL, Guo ZX, Yu J, 2009. Surface engineering of poly(D,L-lactic acid) by entrapment of soluble eggshell membrane protein. J Biomed Mater Res A, 91, 3, 701-7.

Luan Q, Desta T, Chehab L, Sanders VJ, Plattner J, Graves DT, 2008. Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial. J Dent Res, 87, 2, 148-52.

Luliang L, 1995. Extracting process of egg membrane extract and application in cosmetics, Google Patents http://www.google.com/patents/CN1111514A?cl=en.

Lynn AK, DuQuesnay DL, 2002. Hydroxyapatite-coated Ti-6Al-4V part 1: the effect of coating thickness on mechanical fatigue behaviour. Biomaterials, 23, 9, 1937-46.

Mandair GS, Morris MD, 2015. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. Bonekey Rep, 4, 620.

Marino FT, Torres J, Tresguerres I, Jerez LB, Cabarcos EL, 2007. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. J Biomed Mater Res A, 81, 1, 93-102.

Marsell R, Einhorn TA, 2011. The biology of fracture healing. Injury, 42, 6, 551-5.

Massague J, 1990. The transforming growth factor-beta family. Annual review of cell biology, 6, 597-641.

Mathew M, Takagi S, 2001. Structures of biological minerals in dental research. J Res Natl Inst Stand Technol, 106, 6, 1035-44.

Matsuya Y, Matsuya S, Antonucci JM, Takagi S, Chow LC, Akamine A, 1999. Effect of powder grinding on hydroxyapatite formation in a polymeric calcium phosphate cement prepared from tetracalcium phosphate and poly(methyl vinyl ether-maleic acid). Biomaterials, 20, 7, 691-7.

Medicinenet 2015. Definition of bone mineral density, Erişim tarihi 05 Mayıs 2015. Erişim adresi, http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=24481

Meffert RM, Langer B, Fritz ME, 1992. Dental implants: a review. J Periodontol, 63, 11, 859-70.

Menéndez-Proupin E, Cervantes-Rodríguez S, Osorio-Pulgar R, Franco-Cisterna M, Camacho-Montes H, Fuentes ME, 2011. Computer simulation of elastic constants of hydroxyapatite and fluorapatite. J Mech Behav Biomed Mater, 4, 7, 1011-20.

Meng L-J, Dos Santos M, 1993. The influence of oxygen partial pressure on the properties of DC reactive magnetron sputtered titanium oxide films. Appl Surf Sci, 68, 3, 319-25.

MicroCT World 2015a. Trabecular Thickness (Tb.Th), Trabecular Spacing (Tb.Sp), Trabecular Number (Tb.N), Erişim tarihi 16 Nisan 2015. Erişim adresi, http://microctworld.net/trabecular-thickness-tb-th-trabecular-spacing-tb-sp-trabecular-number-tb-n/

MicroCt World 2015b. Bone volume density (BV/TV) – Light version, Erişim tarihi 16 Nisan 2015. Erişim adresi, http://microctworld.net/bvtv-bone-volume-density/

Mine Y, Oberle C, Kassaify Z, 2003. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. J Agric Food Chem, 51, 1, 249-53.

Mirtchi AA, Lemaître J, Hunting E, 1989 b. Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of the β-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements. Biomaterials, 10, 9, 634-8.

Mirtchi AA, Lemaitre J, Terao N, 1989a. Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate--monocalcium phosphate system. Biomaterials, 10, 7, 475-80.

Misch CE, 1999. Contemporary Implant Dentistry 2nd ed St. Louis: Mosby; 1999, p.

Mistry S, Kundu D, Datta S, Basu D, 2011. Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone. Aust Dent J, 56, 1, 68-75.

Mobasherpour I, Heshajin MS, Kazemzadeh A, Zakeri M, 2007. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method. J Alloys Compd, 430, 1–2, 330-3.

Monmaturapoj N, 2008. Nano-size hydroxyapatite powders preparation by wet-chemical precipitation route. Journal of Metals, Materials and Minerals, 18, 1, 15-20.

Montazeri N, Jahandideh R, Biazar E, 2011. Synthesis of fluorapatite–hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations. Int J Nanomedicine, 6, 197-201.

Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Ruegsegger P, 1998. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. Bone, 23, 1, 59-66.

Murphy WL, Kohn DH, Mooney DJ, 2000. Growth of continuous bonelike mineral within porous poly(lactide-co-glycolide) scaffolds in vitro. J Biomed Mater Res, 50, 1, 50-8.

Nafei A, Kabel J, Odgaard A, Linde F, Hvid I, 2000. Properties of growing trabecular ovine bone. Part II: architectural and mechanical properties. J Bone Joint Surg Br, 82, 6, 921-7.

Nakano T, Ikawa NI, Ozimek L, 2003. Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. Poult Sci, 82, 3, 510-4.

Nancollas GH, Johnsson MA, 1994. Calculus formation and inhibition. Adv Dent Res, 8, 2, 307-11.

Nandi SK, Biswas S, 2013. In Vivo Characterization of Biomaterials. In: Characterization of Biomaterials. Eds: Bose AB, first ed. Oxford: Academic Press, p. 255-97.

Narayanan R, Seshadri S, Kwon T, Kim K, 2008. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 85, 1, 279-99.

Narbat M, Orang F, Hashtjin M, Goudarzi A, 2006. Fabrication of Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Iranian Biomedical Journal, 10, 4, 215-23.

Nayab SN, Jones FH, Olsen I, 2005. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. Biomaterials, 26, 23, 4717-27.

Neelakandeswari N, Sangami G, Dharmaraj N, 2011. Preparation and characterization of nanostructured hydroxyapatite using a biomaterial. Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry, 41, 5, 513-6.

Newman E, Turner AS, Wark JD, 1995. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. Bone, 16, 4 Suppl, 277-84.

Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC, 1998. Use of animal models in musculoskeletal research. Iowa Orthop J, 18, 118-23.

Nouri A, Chen X, Hodgson PD, Long JM, Yamada Y, Wen C. Preparation of bioactive porous Ti-Sn-Nb alloy for biomedical applications. 5th International Conference on Porous Metals and Metallic Foams: p. 307-10, 5-7 September 2007, Montreal, Canada.

Nyman JS, Reyes M, Wang X, 2005. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. Micron, 36, 7–8, 566-82.

Nys Y, Gautron J, McKee M, Garcia-Ruiz J, Hincke M, 2001. Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens. World's Poultry Science Journal, 57, 04, 401-13.

Odgaard A, 1997. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. Bone, 20, 4, 315-28.

Ohtsuka Y, Matsuura M, Chida N, Yoshinari M, Sumii T, Dérand T, 1994. Formation of hydroxyapatite coating on pure titanium substrates by ion beam dynamic mixing. Surf Coat Technol, 65, 1–3, 224-30.

Oi T, Saka H, Ide Y, 2004. Three-dimensional observation of pulp cavities in the maxillary first premolar tooth using micro-CT. Int Endod J, 37, 1, 46-51.

Olejniczak AJ, Grine FE, 2006. Assessment of the accuracy of dental enamel thickness measurements using microfocal X-ray computed tomography. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 288A, 3, 263-75.

Olejniczaka AJ, Grineb FE, 2005. High-resolution measurement of Neandertal tooth enamel thickness by micro-focal computed tomography. S Afr J Sci, 219-20.

Ong JL, Lucas LC, 1994. Post-deposition heat treatments for ion beam sputter deposited calcium phosphate coatings. Biomaterials, 15, 5, 337-41.

Ong JL, Yang Y, Oh S, Appleford M, Chen W, Liu Y, Kim K-H, Park S, Bumgardner J, Haggard W, 2009. Calcium Phosphate Coating Produced by a Sputter Deposition Process. In: Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. Eds:Leon B, Jansen JA, first edition, New York: Springer Press, p. 175-98.

Padmanabhan SK, Balakrishnan A, Chu M-C, Lee YJ, Kim TN, Cho S-J, 2009. Sol–gel synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods. Particuology, 7, 6, 466-70.

Palti A, Hoch T, 2002. A concept for the treatment of various dental bone defects. Implant Dent, 11, 1, 73-8.

Pan Z, Ding J, 2012. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. Interface focus, 2, 3, 366-77.

Parekh RB, Shetty O, Tabassum R, 2012. Surface modifications of endosseous dental implants.Int J Oral Imp Clin Res, 3, 3, 116-21.

Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS, 1983. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. J Clin Invest, 72, 4, 1396-409.

Park J-W, Park K-B, Suh J-Y, 2007. Effects of calcium ion incorporation on bone healing of Ti6Al4V alloy implants in rabbit tibiae. Biomaterials, 28, 22, 3306-13.

Park JW, Bae SR, Suh JY, Lee DH, Kim SH, Kim H, Lee CS, 2008. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: a pilot study. J Biomed Mater Res A, 87, 1, 203-14.

Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY, 2009. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. Clin Oral Implants Res, 20, 4, 372-8.

Park YS, Yi KY, Lee IS, Jung YC, 2005. Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration. Clin Oral Implants Res, 16, 2, 156-60.

Parsegian VA, 1983. Molecular forces governing tight contact between cellular surfaces and substrates. J Prosthet Dent, 49, 6, 838-42.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG, 2007. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. Eur Cell Mater, 13, 1-10.

Peraire C, Arias JL, Bernal D, Pou J, Leon B, Arano A, Roth W, 2006. Biological stability and osteoconductivity in rabbit tibia of pulsed laser deposited hydroxylapatite coatings. J Biomed Mater Res A, 77, 2, 370-9.

Poland AL, Sheldon BW, 2001. Altering the thermal resistance of foodborne bacterial pathogens with an eggshell membrane waste by-product. J Food Prot, 64, 4, 486-92.

Poth N, Seiffart V, Gross G, Menzel H, Dempwolf W, 2015. Biodegradable Chitosan Nanoparticle Coatings on Titanium for the Delivery of BMP-2. Biomolecules, 5, 1, 3-19.

Pramanik S, Agarwal AK, Rai K, 2005. Development of high strength hydroxyapatite for hard tissue replacement. Trends. Biomater Artif Organs, Vl, 19, 1, 46-51.

Puleo DA, Nanci A, 1999. Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials, 20, 23-24, 2311-21.

Radin S, Ducheyne P, 1992. Plasma spraying induced changes of calcium phosphate ceramic characteristics and the effect onin vitro stability. J Mater Sci Mater Med, 3, 1, 33-42.

Rahn H, Paganelli C, 1982. Role of diffusion in gas exchange of the avian egg. Fed Proc, 41, 6, 2134-6.

Rakngarm Nimkerdphol A, Otsuka Y, Mutoh Y, 2014. Effect of dissolution/precipitation on the residual stress redistribution of plasma-sprayed hydroxyapatite coating on titanium substrate in simulated body fluid (SBF). J Mech Behav Biomed Mater, 36, 0, 98-108.

Rebaudi A, Koller B, Laib A, Trisi P, 2004. Microcomputed tomographic analysis of the peri-implant bone. Int J Periodontics Restorative Dent, 24, 4, 316-25.

Reid JW, Tuck L, Sayer M, Fargo K, Hendry JA, 2006. Synthesis and characterization of single-phase silicon-substituted alpha-tricalcium phosphate. Biomaterials, 27, 15, 2916-25.

Reigstad O, Franke-Stenport V, Johansson CB, Wennerberg A, Rokkum M, Reigstad A, 2007. Improved bone ingrowth and fixation with a thin calcium phosphate coating intended for complete resorption. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 83, 1, 9-15.

Reigstad O, Johansson C, Stenport V, Wennerberg A, Reigstad A, Rokkum M, 2011. Different patterns of bone fixation with hydroxyapatite and resorbable CaP coatings in the rabbit tibia at 6, 12, and 52 weeks. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 99, 1, 14-20.

Remy E, Thiel E, 2002. Medial axis for chamfer distances: computing look-up tables and neighbourhoods in 2D or 3D. Pattern Recognit Lett, 23, 6, 649-61.

Rivera EM, Araiza M, Brostow W, Castaño VM, Díaz-Estrada JR, Hernández R, Rodríguez JR, 1999. Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. Mater Lett, 41, 3, 128-34.

Rossnagel SM, Cuomo JJ, 1988. Ion Beam Deposition, Film Modification and Synthesis. MRS Bull, 13, 12, 40-5.

Roufosse AH, Landis WJ, Sabine WK, Glimcher MJ, 1979. Identification of brushite in newly deposited bone mineral from embryonic chicks. J Ultrastruct Res, 68, 3, 235-55.

Roy M, Vamsi Krishna B, Bandyopadhyay A, Bose S, 2008. Laser processing of bioactive tricalcium phosphate coating on titanium for load-bearing implants. Acta Biomater, 4, 2, 324-33.

Ruff KJ, DeVore DP, Leu MD, Robinson MA, 2009a. Eggshell membrane: a possible new natural therapeutic for joint and connective tissue disorders. Results from two open-label human clinical studies. Clin Interv Aging, 4, 235-40.

Ruff KJ, Winkler A, Jackson RW, DeVore DP, Ritz BW, 2009b. Eggshell membrane in the treatment of pain and stiffness from osteoarthritis of the knee: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled clinical study. Clin Rheumatol, 28, 8, 907-14.

Ryan G, Pandit A, Apatsidis DP, 2006. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. Biomaterials, 27, 13, 2651-70.

Ryland AL, 1958. X-ray diffraction. J Chem Educ, 35, 2, 80.

Sahu A, Nandakumar N, Sawant S, Krishna CM, 2015. Recurrence prediction in oral cancers: a serum Raman spectroscopy study. Analyst, 140, 7, 2294-301.

Saito N, Takaoka K, 2003. New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. Biomaterials, 24, 13, 2287-93.

Sakai WS, 1973. Simple Method for Differential Staining of Paraffin Embedded Plant Material Using Toluidine Blue O. Biotechnic & Histochemistry, 48, 5, 247-9.

Salama A, El-Sakhawy M, 2014. Preparation of polyelectrolyte/calcium phosphate hybrids for drug delivery application. Carbohydr Polym, 113, 0, 500-6.

Samek O, Mlynarikova K, Bernatova S, Jezek J, Krzyzanek V, Siler M, Zemanek P, Ruzicka F, Hola V, Mahelova M, 2014. Candida parapsilosis biofilm identification by Raman spectroscopy. Int J Mol Sci, 15, 12, 23924-35.

Sarikaya M, 1999. Biomimetics: materials fabrication through biology. Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 25, 14183-5.

Sarikaya M, Tamerler C, Jen AK, Schulten K, Baneyx F, 2003. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. Nat Mater, 2, 9, 577-85.

Sasano Y, Kamakura S, Homma H, Suzuki O, Mizoguchi I, Kagayama M, 1999. Implanted octacalcium phosphate (OCP) stimulates osteogenesis by osteoblastic cells and/or committed osteoprogenitors in rat calvarial periosteum. Anat Rec, 256, 1, 1-6.

Saulacic N, Bosshardt DD, Bornstein MM, Berner S, Buser D, 2012. Bone apposition to a titanium-zirconium alloy implant, as compared to two other titanium-containing implants. European cells & materials, 23, 273-86; discussion 86-8.

Sayer M, Stratilatov AD, Reid J, Calderin L, Stott MJ, Yin X, MacKenzie M, Smith TJ, Hendry JA, Langstaff SD, 2003. Structure and composition of silicon-stabilized tricalcium phosphate. Biomaterials, 24, 3, 369-82.

Schaafsma A, Pakan I, 1999. Short-term effects of a chicken egg shell powder enriched dairy-based products on bone mineral density in persons with osteoporosis or osteopenia. Bratisl Lek Listy, 100, 12, 651-6.

Scharnweber D, Bierbaum S, 2009. Electrochemically Assisted Deposition of Thin CaP Coatings. In: Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. Eds: León B, Jansen J, first edition, New York: Springer, p. 215-61.

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG, 2008. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. Semin Cell Dev Biol, 19, 5, 459-66.

Scott JC, 1997. Epidemiology of osteoporosis. Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases, 3, 2 Suppl, 9-13.

Shao C, Yuan B, Wang H, Zhou Q, Li Y, Guan Y, Deng Z, 2011. Eggshell membrane as a multimodal solid state platform for generating fluorescent metal nanoclusters. J Mater Chem, 21, 9, 2863-6.

Shih YR, Chen CN, Tsai SW, Wang YJ, Lee OK, 2006. Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. Stem cells (Dayton, Ohio), 24, 11, 2391-7.

Shindo D, Oikawa T, 2002. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy. In: Analytical Electron Microscopy for Materials Science first edition Japan, Springer, p. 81-102.

Simank H-G, Stuber M, Frahm R, Helbig L, van Lenthe H, Müller R, 2006. The influence of surface coatings of dicalcium phosphate (DCPD) and growth and differentiation factor-5 (GDF-5) on the stability of titanium implants in vivo. Biomaterials, 27, 21, 3988-94.

Sinyaev VA, Shustikova ES, Levchenko LV, Sedunov AA, 2001. Synthesis and Dehydration of Amorphous Calcium Phosphate. Inorganic Materials, 37, 6, 619-22.

Siva Rama Krishna D, Siddharthan A, Seshadri SK, Sampath Kumar TS, 2007. A novel route for synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from eggshell waste. J Mater Sci Mater Med, 18, 9, 1735-43.

Sivakumar M, Kumar TSS, Shantha KL, Rao KP, 1996. Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. Biomaterials, 17, 17, 1709-14.

Smith DC, Pilliar RM, Chernecky R, 1991. Dental implant materials. I. Some effects of preparative procedures on surface topography. J Biomed Mater Res, 25, 9, 1045-68.

Snehalatha M, Ravikumar C, Hubert Joe I, Sekar N, Jayakumar VS, 2009. Spectroscopic analysis and DFT calculations of a food additive Carmoisine. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 72, 3, 654-62.

Sobe G, Schreiber H, Weise G, Heinrich A, 1993. On the Causes and Effects of Contaminations during rf Diode Deposition of Cr-Si Alloys. Contributions to Plasma Physics, 33, 4, 325-35.

Sokolsky-Papkov M, Agashi K, Olaye A, Shakesheff K, Domb AJ, 2007. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev, 59, 4-5, 187-206.

Song PK, Shigesato Y, Yasui I, Ow-Yang CW, Paine DC, 1998. Study on crystallinity of tin-doped indium oxide films deposited by dc magnetron sputtering. J Appl Phys, 37, 4R, 1870.

Steele JG, McFarland C, Dalton BA, Johnson G, Evans MD, Howlett CR, Underwood PA, 1993. Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment. J Biomater Sci Polym Ed, 5, 3, 245-57.

Steigenga JT, al-Shammari KF, Nociti FH, Misch CE, Wang HL, 2003. Dental implant design and its relationship to long-term implant success. Implant Dent, 12, 4, 306-17.

Steinemann SG, 1998. Titanium the material of choice? Periodontology 2000, 17, 7-21.

Stigter M, Bezemer J, de Groot K, Layrolle P, 2004. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. J Control Release, 99, 1, 127-37.

Stuart B, 2000. Infrared Spectroscopy. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Eds: John Wiley & Sons, Inc., p. 1-20.

Suh JY, Jeung OC, Choi BJ, Park JW, 2007. Effects of a novel calcium titanate coating on the osseointegration of blasted endosseous implants in rabbit tibiae. Clin Oral Implants Res, 18, 3, 362-9.

Sukumaran A, Cuijpers VM, Preethanath RS, Aldosari AA, Jansen JA, 2013. Osseointegration of oral implants after delayed placement in rabbits: a microcomputed tomography and histomorphometric study. Int J Oral Maxillofac Implants, 28, 6, 1506-11.

Sun L, Chow LC, Frukhtbeyn SA, Bonevich JE, 2010. Preparation and Properties of Nanoparticles of Calcium Phosphates With Various Ca/P Ratios. J Res Natl Inst Stand Technol, 115, 4, 243-55.

Suzuki O, Nakamura M, Miyasaka Y, Kagayama M, Sakurai M, 1991. Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. The Tohoku journal of experimental medicine, 164, 1, 37-50.

Swartz SM, Parker A, Huo C, 1998. Theoretical and empirical scaling patterns and topological homology in bone trabeculae. J Exp Biol, 201, Pt 4, 573-90.

Takahashi K, Hattori M, 1994. Regulation of collagen matrix reconstruction by phosphated polysaccharides. Biosci Biotechnol Biochem, 58, 1, 178-82.

Takahashi K, Shirai K, Kitamura M, Hattori M, 1996. Soluble egg shell membrane protein as a regulating material for collagen matrix reconstruction. Biosci Biotechnol Biochem, 60, 8, 1299-302.

Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M, 2008. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. J Mater Sci Mater Med, 19, 8, 2949-52.

Tamimi F, Kumarasami B, Doillon C, Gbureck U, Le Nihouannen D, Cabarcos EL, Barralet JE, 2008c. Brushite-collagen composites for bone regeneration. Acta Biomater, 4, 5, 1315-21.

Tamimi F, Torres J, Bettini R, Ruggera F, Rueda C, Lopez-Ponce M, Lopez-Cabarcos E, 2008a. Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases. J Biomed Mater Res A, 85, 3, 707-14.

Tamimi F, Torres J, Gbureck U, Lopez-Cabarcos E, Bassett DC, Alkhraisat MH, Barralet JE, 2009. Craniofacial vertical bone augmentation: a comparison between 3D printed monolithic monetite blocks and autologous onlay grafts in the rabbit. Biomaterials, 30, 31, 6318-26.

Tamimi F, Torres J, Kathan C, Baca R, Clemente C, Blanco L, Lopez Cabarcos E, 2008b. Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules. J Biomed Mater Res A, 87, 4, 980-5.

Tan F, Naciri M, Dowling D, Al-Rubeai M, 2012. In vitro and in vivo bioactivity of CoBlast hydroxyapatite coating and the effect of impaction on its osteoconductivity. Biotechnology advances, 30, 1, 352-62.

Tanaka S, Takaba M, Ishiura Y, Kamimura E, Baba K, 2015. A 3-year follow-up of ceria-stabilized zirconia/alumina nanocomposite (Ce-TZP/A) frameworks for fixed dental prostheses. J Prosthodont Res, 59, 1, 55-61.

Tao Y, Lu Y, Sun Y, Gu B, Lu W, Pan J, 2009. Development of mucoadhesive microspheres of acyclovir with enhanced bioavailability. Int J Pharm, 378, 1-2, 30-6.

Tas AC, Bhaduri SB, 2004. Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10× simulated body fluid. J Mater Res, 19, 09, 2742-9.

Taylor TKF, Little K, 1963. Calcification in the Intervertebral Disk. Nature, 199, 4893, 612-3.

Tengvall P, Elwing H, Sjoqvist L, Lundstrom I, Bjursten LM, 1989. Interaction between hydrogen peroxide and titanium: a possible role in the biocompatibility of titanium. Biomaterials, 10, 2, 118-20.

Tengvall P, Skoglund B, Askendal A, Aspenberg P, 2004. Surface immobilized bisphosphonate improves stainless-steel screw fixation in rats. Biomaterials, 25, 11, 2133-8.

TenHuisen KS, Brown PW, 1998. Formation of calcium-deficient hydroxyapatite from alpha-tricalcium phosphate. Biomaterials, 19, 23, 2209-17.

Thomas KA, Cook SD, Haddad RJ, Jr., Kay JF, Jarcho M, 1989. Biologic response to hydroxylapatite-coated titanium hips. A preliminary study in dogs. J Arthroplasty, 4, 1, 43-53.

Torres J, Tamimi F, Alkhraisat MH, Prados-Frutos JC, Rastikerdar E, Gbureck U, Barralet JE, Lopez-Cabarcos E, 2011. Vertical bone augmentation with 3D-synthetic monetite blocks in the rabbit calvaria. J Clin Periodontol, 38, 12, 1147-53.

Trire A, Martini D, Orsini E, Franchi M, De Pasquale V, Bacchelli B, Raspanti M, Ruggeri A, Ottani V, 2010. Correlative microscopy of bone in implant osteointegration studies. ScientificWorldJournal, 10, 2238-47.

Tsai WT, Yang JM, Lai CW, Cheng YH, Lin CC, Yeh CW, 2006. Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. Bioresour Technol, 97, 3, 488-93.

Tverdynin MS, Bulanova TP, Chernysheva ES, 1980. [Pappenheim method of panoptic staining of histological sections]. Arkhiv patologii, 42, 1, 80-1.

Ummethala R, Despang F, Gelinsky M, Basu B, 2011. In vitro corrosion and mineralization of novel Ti–Si–C alloy. Electrochimica Acta, 56, 11, 3809-20.

Uygur S, Ozmen S, Kandal S, Lortlar N, Omeroglu S, Arac M, Cenetoglu S, 2011. Reconstruction of cranial bone defects using Struthio camelus eggshell. J Craniofac Surg, 22, 5, 1843-6.

van Dijk K, Schaeken HG, Wolke JCG, Marée CHM, Habraken FHPM, Verhoeven J, Jansen JA, 1995. Influence of discharge power level on the properties of hydroxyapatite films deposited on Ti6A14V with RF magnetron sputtering. J Biomed Mater Res, 29, 2, 269-76.

van Dijk K, Schaeken HG, Wolke JGC, Jansen JA, 1996. Influence of annealing temperature on RF magnetron sputtered calcium phosphate coatings. Biomaterials, 17, 4, 405-10.

Vanzillotta PS, Sader MS, Bastos IN, Soares GdA, 2006. Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments. Dent Mater, 22, 3, 275-82.

Varma HK, Yokogawa Y, Espinosa FF, Kawamoto Y, Nishizawa K, Nagata F, Kameyama T, 1999. Porous calcium phosphate coating over phosphorylated chitosan film by a biomimetic method. Biomaterials, 20, 9, 879-84.

Venkat R, Gopichander N, Vasantakumar M, 2013. Comprehensive analysis of repair/reinforcement materials for polymethyl methacrylate denture bases: mechanical and dimensional stability characteristics. J Indian Prosthodont Soc, 13, 4, 439-49.

Vereecke G, Lemaître J, 1990. Calculation of the solubility diagrams in the system Ca(OH)2-H3PO4-KOH-HNO3-CO2-H2O. J Cryst Growth, 104, 4, 820-32.

Vicario A, Sergo V, Toffoli G, Bonifacio A, 2015. Surface-enhanced Raman spectroscopy of the anti-cancer drug irinotecan in presence of human serum albumin. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 127c, 41-6.

Wang BC, Lee TM, Chang E, Yang CY, 1993. The shear strength and the failure mode of plasma-sprayed hydroxyapatite coating to bone: the effect of coating thickness. J Biomed Mater Res, 27, 10, 1315-27.

Wang W, Chen S, Zhang L, Wu X, Wang J, Chen JF, Le Y, 2015. Poly(lactic acid)/chitosan hybrid nanoparticles for controlled release of anticancer drug. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 46, 514-20.

Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM, 1998. An interspecies comparison of bone fracture properties. Biomed Mater Eng, 8, 1, 1-9.

Wang XX, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A, 2002. Bioactive titania-gel layers formed by chemical treatment of Ti substrate with a H2O2/HCl solution. Biomaterials, 23, 5, 1353-7.

Wang Y, Zhang S, Wei K, Zhao N, Chen J, Wang X, 2006. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template. Mater Lett, 60, 12, 1484-7.

Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R, 2001. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. Biomaterials, 22, 11, 1327-33.

Wei J, Wang J, Shan W, Liu X, Ma J, Liu C, Fang J, Wei S, 2011. Development of fluorapatite cement for dental enamel defects repair. J Mater Sci Mater Med, 22, 6, 1607-14.

Wei M, Evans JH, Bostrom T, Grøndahl L, 2003. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. J Mater Sci Mater Med, 14, 4, 311-20.

Weigl P, 2003. Implant prosthodontics: what next? Quintessence Int, 34, 9, 653-69.

Weiss CM, 1986. Tissue integration of dental endosseous implants: description and comparative analysis of the fibro-osseous integration and osseous integration systems. J Oral Implantol, 12, 2, 169-214.

Weiss CM, 1987. A comparative analysis of fibro-osteal and osteal integration and other variables that affect long term bone maintenance around dental implants. J Oral Implantol, 13, 3, 467-87.

Wen HB, Liu Q, De Wijn JR, De Groot K, Cui FZ, 1998. Preparation of bioactive microporous titanium surface by a new two-step chemical treatment. J Mater Sci Mater Med, 9, 3, 121-8.

Wen HB, Wolke JG, de Wijn JR, Liu Q, Cui FZ, de Groot K, 1997. Fast precipitation of calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments. Biomaterials, 18, 22, 1471-8.

Weng J, Liu X, Zhang X, Ji X, 1994. Thermal decomposition of hydroxyapatite structure induced by titanium and its dioxide. J Mater Sci Lett, 13, 3, 159-61.

Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ, 1995. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. Clin Oral Implants Res, 6, 1, 24-30.

Wikesjo UM, Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Rohrer MD, Prasad HS, Wozney JM, Hall J, 2008. Bone formation at recombinant human bone morphogenetic protein-2-coated titanium implants in the posterior maxilla (Type IV bone) in non-human primates. J Clin Periodontol, 35, 11, 992-1000.

Williams D, Carter CB, 1996. The Transmission Electron Microscope. In: Transmission Electron Microscopy. Eds: Williams D, Carter CB, USA, Springer, p. 3-17.

Williams DF, 1999. The Williams Dictionary of Biomaterials. First ed. Liverpool, Liverpool University Press, p. 42.

Wojcik SM, Puleo DA, 1997. Biochemical surface modification of Ti-6Al-4V for the delivery of protein to the cell-biomaterial interface. Biomed Sci Inst, 33, 166-71.

Wolke JGC, de Blieck-Hogervorst JMA, Dhert WJA, Klein CPAT, de Groot K, 1992. Studies on the thermal spraying of apatite bioceramics. J Therm Spray Technol, 1, 1, 75-82.

Wong M, Hendrix MJ, von der Mark K, Little C, Stern R, 1984. Collagen in the egg shell membranes of the hen. Dev Biol, 104, 1, 28-36.

Wozney JM, 1989. Bone Morphogenetic Proteins. Progress in Growth Factor Research, 1, 4, 267-80.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA, 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science, 242, 4885, 1528-34.

Wu G, Liu Y, Iizuka T, Hunziker EB, 2010. Biomimetic coating of organic polymers with a protein-functionalized layer of calcium phosphate: the surface properties of the carrier influence neither the coating characteristics nor the incorporation mechanism or release kinetics of the protein. Tissue Eng Part C Methods, 16, 6, 1255-65.

Wu T-M, Rodriguez JP, Fink DJ, Carrino DA, Blackwell J, Capalan AI, Heuer AH, 1995. Crystallization studies on avian eggshell membranes: Implications for the molecular factors controlling eggshell formation. Matrix Biol, 14, 6, 507-13.

Yamaki K, Kataoka Y, Ohtsuka F, Miyazaki T, 2012. Micro-CT evaluation of in vivo osteogenesis at implants processed by wire-type electric discharge machining. Dent Mater J, 31, 3, 427-32.

Yang F, Wolke JGC, Jansen JA, 2008. Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly(ε-caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering. Chemical Engineering Journal, 137, 1, 154-61.

Yang H, Yang S, Kong J, Dong A, Yu S, 2015. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. Nat protoc, 10, 3, 382-96.

Yi F, Guo Z-X, Zhang L-X, Yu J, Li Q, 2004. Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility. Biomaterials, 25, 19, 4591-9.

Yi F, Yu J, Guo Z-X, Zhang L-X, Li Q, 2003. Natural Bioactive Material: A Preparation of Soluble Eggshell Membrane Protein. Macromol Biosci, 3, 5, 234-7.

Yin X, Stott MJ, 2005. Theoretical insights into bone grafting silicon-stabilized alpha-tricalcium phosphate. J Chem Phys, 122, 2, 024709.

Yin X, Stott MJ, Rubio A, 2003. α- and β-tricalcium phosphate: A density functional study. Physical Review B, 68, 20, 205.

Yokogawa Y, Kawamoto Y, Toriyama M, Suzuki T, Kawamura S, 1991. Tricalcium Phosphate Coating on Zirconia by Using Calcium Metaphosphate and Tetracalcium Phosphate. J Ceram Soc Jpn, 99, 1147, 211-4.

Yoshimine Y, Maeda K, 1995. Histologic evaluation of tetracalcium phosphate-based cement as a direct pulp-capping agent. Oral surg, oral med, oral pathol, oral radiol, and endod, 79, 3, 351-8.

Yoshimine Y, Sumi M, Isobe R, Anan H, Maeda K, 1996. In vitro interaction between tetracalcium phosphate-based cement and calvarial osteogenic cells. Biomaterials, 17, 23, 2241-5.

Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP, 2003. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. Biomaterials, 24, 12, 2077-82.

Yoshinari M, 2009. Ion Beam Techniques for Thin Calcium Phosphate Coating Production. In: Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. Eds: León B, Jansen J, New York, Springer, p. 157-74.

Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K, 2001a. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. Biomaterials, 22, 14, 2043-8.

Yoshinari M, Oda Y, Ueki H, Yokose S, 2001b. Immobilization of bisphosphonates on surface modified titanium. Biomaterials, 22, 7, 709-15.

Yoshinari M, Ozeki K, Sumii T, 1991. Properties of hydroxyapatite-coated Ti-6Al-4V alloy produced by the ion-plating method. The Bulletin of Tokyo Dental College, 32, 4, 147-56.

Yurtcan MT, Şimşek Ö, Ertuğrul M, 2011. Darbeli Lazer Yığma Sistemi (PLD) ile YBCO İnce Filmlerin Hazırlanması. EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4, 2, 157-67.

Zadik Y, 2007. Self-treatment of full-thickness traumatic lip laceration with chicken egg shell membrane. Wilderness Environ Med, 18, 3, 230-1.

Zagury R, Harari ND, Conz MB, Soares Gde A, Vidigal GM, Jr., 2007. Histomorphometric analyses of bone interface with titanium-aluminum-vanadium and hydroxyapatite-coated implants by biomimetic process. Implant Dent, 16, 3, 290-6.

Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R, Mailath G, Watzek G, 2003. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. Int J Oral Maxillofac Implants, 18, 1, 15-22.

Zhang Q, Leng Y, 2005a. Electrochemical activation of titanium for biomimetic coating of calcium phosphate. Biomaterials, 26, 18, 3853-9.

Zhang Q, Leng Y, Xin R, 2005. A comparative study of electrochemical deposition and biomimetic deposition of calcium phosphate on porous titanium. Biomaterials, 26, 16, 2857-65.

Zhang W, Wang G, Liu Y, Zhao X, Zou D, Zhu C, Jin Y, Huang Q, Sun J, Liu X, Jiang X, Zreiqat H, 2013. The synergistic effect of hierarchical micro/nano-topography and bioactive ions for enhanced osseointegration. Biomaterials, 34, 13, 3184-95.

Zhang Y, Jia W, Cui M, Dong C, Shuang S, Kwan Y, Choi MMF, 2011 Glucose biosensor based on nanohybrid material of gold nanoparticles and glucose oxidase on a bioplatform. Biotechnology Journal, 6, 5, 492-500.

Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM, 2005. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 72, 1, 156-65.

Zhao CY, Fan HS and Zhang XD 2011. Advances in Biomimetic Apatite Coating on Metal Implants, In: Advances in Biomimetics, Ed: Cavrak M, InTech, Erişim tarihi 22 Mayıs 2015. Erişim adresi, http://www.intechopen.com/books/advances-in-biomimetics/advances-in-biomimetic-apatite-coating-on-metal-implants.

Zheng B, Xie S, Qian L, Yuan H, Xiao D, Choi MMF, 2011. Gold nanoparticles-coated eggshell membrane with immobilized glucose oxidase for fabrication of glucose biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical, 152, 1, 49-55.

Zheng W, Li XM, Yang Q, Zeng GM, Shen XX, Zhang Y, Liu JJ, 2007. Adsorption of Cd(II) and Cu(II) from aqueous solution by carbonate hydroxylapatite derived from eggshell waste. J Hazard Mater, 147, 1-2, 534-9.

Zhou HH, Li H, Guo LH, 2007. Molecular and crystal structure characterization of calcium-deficient apatite. Key Eng Mater, 330, 119-22.

Zhou J, Wang S, Nie F, Feng L, Zhu G, Jiang L, 2011. Elaborate architecture of the hierarchical hen's eggshell. Nano Research, 4, 2, 171-9.

Zhu W, Sugano N, Pezzotti G, 2013. Nondestructive inspection of phase transformation in zirconia-containing hip joints by confocal Raman spectroscopy. J Biomed Opt, 18, 12, 127002.

8. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Kayseri' de doğdu. İlköğrenimini TED Kayseri Koleji'nde, ortaöğrenimini Nuh Mehmet Küçükçalık Anadolu Lisesi'nde ve lise öğrenimini Kayseri Melikgazi Fen Lisesi'nde tamamladı. 2003 yılında başladığı Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. Halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Bekardır.