BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METAL KATKILI BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT/KİTOSAN ESASLI DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burak ÇEPER

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü

TEMMUZ 2021

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METAL KATKILI BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT/KİTOSAN ESASLI DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burak ÇEPER

(181212874001)

ORCID:

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şeyma DUMAN

ORCID:

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hatice Kübra AKBEN

ORCID:

TEMMUZ 2021

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 181212874001 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi BURAK ÇEPER, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "METAL KATKILI BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT/KİTOSAN ESASLI DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı :	**Dr. Öğr. Üyesi Şeyma DUMAN** Bursa Teknik Üniversitesi	.....
Eş Danışman :	**Dr. Öğr. Üyesi Hatice Kübra AKBEN** İstanbul Gedik Üniversitesi	.....
Jüri Üyeleri :	**Doç. Dr. Haslet Ekşi KOÇAK** İstanbul Gedik Üniversitesi	.....
	Dr. Öğr. Üyesi Nazlı AKÇAMLI Bursa Teknik Üniversitesi	.....

Teslim Tarihi : 28 Temmuz 2021

Savunma Tarihi : 01 Temmuz 2021

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Burak ÇEPER

İmzası:

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca tez yönetimimi üstlenen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Şeyma DUMAN'a ve yardımları için eş danıman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hatice Kübra AKBEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü sorunuma yardımcı olmaya çalışan her zaman anlayış ve desteğini gördüğüm değerli çalışma arkadaşım Gaziantep Üniversitesi Bölüm Sekreteri Sakine BAKAN'a,

Hayatım boyunca attığım her adımda olduğu gibi yüksek lisans sürecimde de yanımda olan, her zaman destekleyen ve motive eden, beni olmaktan gurur duyduğum bir şekilde yetiştiren canım aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2021 Araştırma Görevlisi Burak ÇEPER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
KISALTMALAR ..... **viii**
SEMBOLLER ..... **ix**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **x**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xiii**
SUMMARY ..... **xiv**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **5**
2.1 Kemik Doku ve Yapısı 5
2.2 Kemik Doku Mühendisliği 8
2.2.1 Doku iskeleleri ve özellikleri 9
2.3 Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler 11
2.3.1 Metalik biyomalzemeler 12
2.3.1.1 Metal nanopartikül içeren doku iskeleleri 12
2.3.2 Polimerik biyomalzemeler 15
2.3.2.1 Kitosan esaslı doku iskeleleri 18
2.3.3 Biyoseramikler 19
2.3.3.1 Bifazik kalsiyum fosfat (BCP) 23
2.4 Doku İskelesi Üretim Yöntemleri 25
2.4.1 Elektroeğirme 28
2.4.2 Faz Ayırımı 29
2.4.3 Dondurarak kurutma 29
2.5 Biyoaktivite ve Biyobozunurluk 30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR **32**
3.1 Kullanılan Malzemeler 32
3.2 Katkısız ve Katkılı BCP Toz Sentezi 33
3.3 Katkısız ve Katkılı BCP/Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi 36
3.4 Karakterizasyon Çalışmaları 38
3.4.1 Partikül boyut analizleri 38
3.4.2 Faz analizleri 38
3.4.3 Mikroyapı analizleri 38
3.4.4 Şişme çalışmaları 39
3.4.5 Yoğunluk ve gözeneklilik ölçümleri 39
3.4.6 Mekanik dayanım analizi 39
3.5 Yapay Vücut Sıvısı (SBF) Hazırlanması ve Biyoaktivite Çalışmaları 40
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA **41**
4.1 BCP Tozlarının Sentezi ve Karakterizasyonu 41
4.2 Katkılı BCP Tozlarının Sentezi ve Karakterizasyonu 43
4.3 Kompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu 50
4.3.1 Mikroyapı analizi 50
4.3.2 Şişme çalışmaları 54
4.3.3 Porozite ve yoğunluk ölçümleri 55
4.3.4 Mekanik dayanım 55

4.4 Doku İskelelerinin Biyoaktivite Çalışmalarının Sonuçları 56
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 59
KAYNAKLAR 60
ÖZGEÇMİŞ..... 73

KISALTMALAR

3B **:** Üç Boyutlu
BCP **:** Bifazik Kalsiyum Fosfat
Ca/P **:** Kalsiyum/Fosfor Oranı
CaP **:** Kalsiyum Fosfat
CS **:** Kitosan
ECM **:** Hücre Dışı Matris
EDS **:** Enerji Dağılımlı X-Işınları Spektroskopisi
FTIR **:** Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HA **:** Hidroksiapatit
MERLAB **:** Merkezi Araştırma Laboratuvarı
NAG **:** N-Asetil-D-Glukozamin
OCP **:** Oktakalsiyum Fosfat
PBS **:** Fosfat Tampon Çözeltisi
PGA **:** Poliglikolid Asit
PLA **:** Polilaktik Asit
PLGA **:** Polilaktik-Ko-Glikolik Asit
SBF **:** Yapay Vücut Sıvısı
SEM **:** Taramalı Elektron Mikroskobu
TCP **:** Trikalsiyum Fosfat
XRD **:** X Işını Kırınımı
β-TCP **:** Beta Tri Kalsiyum Fosfat

SEMBOLLER

Al	**:** Alüminyum
Ag	**:** Gümüş
Au	**:** Altın
Ca	**:** Kalsiyum
$CaCO_3$	**:** Kalsiyum Karbonat
Ce	**:** Seryum
Co	**:** Kobalt
Cu	**:** Bakır
Eu	**:** Evropiyum
Fe	**:** Demir
Gd	**:** Gadolinyum
HV	**:** Vickers Sertliği
La	**:** Lantan
Mg	**:** Magnezyum
Mn	**:** Mangan
Ni	**:** Nikel
Sm	**:** Samaryum
Sr	**:** Stronsiyum
Tb	**:** Terbiyum
Ti	**:** Titanyum
Yb	**:** İbertiyum
Z	**:** Atom numarası
Zr	**:** Zirkonyum
t	**:** Zaman
V	**:** Hacim
µ	**:** Mikron
w	**:** Ağırlık
°C	**:** Santigrat

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Kemik hücresi tipleri ve fonksiyonları **7**
Çizelge 2.2: Kemiğin yapısındaki bileşenler **7**
Çizelge 2.3: Kortikal ve trabeküler kemiğin mekanik özellikleri **10**
Çizelge 2.4: Kortikal ve trabeküler kemiğin mekanik özellikleri **11**
Çizelge 2.5: Doku iskelelerinde kullanılan bazı polimerik biyomalzemeler ve özellikleri **16**
Çizelge 2.6: Biyoseramiklerin sınıflandırılması ve örnekleri **19**
Çizelge 2.7: Kalsiyum fosfat seramikler ve yoğunlukları **21**
Çizelge 2.8: Doku iskelesi üretim yöntemleri, bu yöntemlerin avantaj ve dezavantarı, gözenek boyutları ve gözeneklilik oranları **26**
Çizelge 2.9: SBF'lerin ve insan kan plazmasının iyon konsantrasyonları **31**
Çizelge 3.1: Sentezlenen katkısız ve katkılı BCP tozları ve kodları **35**
Çizelge 3.2: Toz sentezi için kullanılan başlangıç malzemelerin miktarları **35**
Çizelge 3.3: Hazırlanan kompozitler ve kodları **36**
Çizelge 3.4: 10xSBF çözeltisindeki kimyasallar **40**
Çizelge 4.1: Sol-jel yöntemi ile sentezlenen La katkılı BCP partiküllerin fiziksel özellikleri **46**
Çizelge 4.2: Sol-jel yöntemi ile sentezlenen La katkılı BCP partiküllerin fiziksel özellikleri **48**
Çizelge 4.3: La ve Sm katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin hesaplanan şişme karakteristikleri **54**
Çizelge 4.4: La ve Sm katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin hesaplanan yoğunluk değerleri ve porozite ölçümleri **55**
Çizelge 4.5: La ve Sm katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin mekanik dayanımları **56**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Kemik dokunun yapısı **5**
Şekil 2.2 : Kemik dokusunun makro boyuttan nano boyuta doğru içeriği **6**
Şekil 2.3 : Doku mühendisliği bileşenleri..... **9**
Şekil 2.4 : Kitin ve kitosanın yapısı..... **17**
Şekil 2.5 : Biyoseramiklerin insan vücudundaki kullanım alanları **20**
Şekil 2.6 : Hidroksiapatitin kristal yapısı **21**
Şekil 2.7 : BCP seramiklerinin biyolojik çevreyle dinamik ve karmaşık etkileşimi **24**
Şekil 2.8 : Elektroeğirme sisteminin bileşenleri **28**
Şekil 2.9 : Faz ayırımı metodunun şematik olarak gösterimi **29**
Şekil 2.10 : Polimerik gözenekli doku iskelesinin dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak üretilmesinin aşamaları **30**
Şekil 3.1 : Kurulan sistem bileşenleri: (a) elde edilen çözelti, (b) vakum filtre sistemi..... **33**
Şekil 3.2 : Vakum filtrasyonundan sonra elde edilen katkısız BCP **34**
Şekil 3.3 : Isıl işlem sonucunda elde edilen La katkılı BCP ve Sm katkılı BCP tozlarının görüntüleri..... **36**
Şekil 3.4 : Doku iskelelerinin üretimi..... **37**
Şekil 4.1 : Sol-jel işleminden sonra 1200 °C'de 3 saat boyunca ısıl işleme tabi tutularak elde edilen katkısız BCP tozlarının XRD analiz sonucu..... **41**
Şekil 4.2 : Katkısız BCP tozlarının (a) 1.00Kx büyütmedeki SEM görüntüsü, (b) 5.00Kx büyütmedeki SEM görüntüsü, (c) EDS analiz sonucu **42**
Şekil 4.3 : Sol-jel yöntemiyle sentezlenen La katkılı BCP partiküllerin XRD analiz sonucu..... **43**
Şekil 4.4 : Sol-jel yöntemiyle sentezlenen Sm katkılı BCP partiküllerin XRD analiz sonucu..... **44**
Şekil 4.5 : Sentezlenen tozların 5.00Kx büyütmedeki SEM görüntüleri: (a) L1B, (b) L2B, (c) L3B, (d) L4B **45**
Şekil 4.6 : EDS analiz sonuçları: (a) L1B, (b) L2B, (c) L3B, (d) L4B..... **45**
Şekil 4.7 : Sentezlenen tozların 5.00Kx büyütmedeki SEM görüntüleri: (a) S1B, (b) S2B, (c) S3B..... **47**
Şekil 4.8 : EDS analiz sonuçları (a) S1B, (b) S2B, (c) S3B **47**
Şekil 4.9 : La katkılı BCP tozlarının FTIR analiz sonuçları **49**
Şekil 4.10 : Sm katkılı BCP tozlarının FTIR analiz sonuçları **49**
Şekil 4.11 : Kompozit doku iskelelerine ait 500x büyütmedeki SEM görüntüleri: (a)K3-B, (b) K3-L1B, (c) K3-L2B, (d) K3-L3B, (e) K3-L4B ve (f) K3-L4B'nin EDS görüntüsü..... **50**
Şekil 4.12 : Kompozit doku iskelelerine ait 500x büyütmedeki SEM görüntüleri: (a)K3-B, (b) K3-S0B, (c) K3-S1B, (d) K3-S2B, (e) K3-L4B..... **51**
Şekil 4.13 :Üretilen La katkılı BCP ile takviyelendirilmiş kompozir doku iskelelerine ait FTIR spektrumu **53**
Şekil 4.14 :Üretilen Sm katkılı BCP ile takviyelendirilmiş kompozir doku iskelelerine ait FTIR spektrumu..... **53**
Şekil 4.15 :7 gün boyunca SBF içerisinde bekletilmiş olan La katkılı kompozit doku iskelelerine ait 500x büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) K3-B-SBF, (b)

K3-L2B-SBF, (c) K3-L4B-SBF, (d) K3-L4B-SBF'nin EDS görüntüsü **57**
Şekil 4.16 : 7 gün boyunca SBF içerisinde bekletilmiş olan Sm katkılı kompozit doku iskelelerine ait 500x büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) K3-B-SBF, (b) K3-S1B-SBF, (c) K3-S2B-SBF, (d) K3-S3B-SBF **58**

METAL KATKILI BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT/KİTOSAN ESASLI DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Kemik, kendini yenileyebilme özelliğine sahip dinamik ve kompozit bir yapıdır. Fakat kemik kayıp oranlarının yüksek olduğu bazı durumlarda kemiğin sahip olduğu bu özellik yetersiz kalabilir. Bu tür olumsuz durumların üstesinden gelebilmek için geleneksel tedavi yöntemlerin yanı sıra yeni bir yaklaşım olan doku mühendisliği uygulamalarına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte doku mühendisliğindeki dikkat çekici gelişmeler, dokuya özgü hücre kültürü faaliyetlerini destekleyen iskelelerin üretimi için biyouyumlu ve gerekli özellikleri taşıyan yeni malzemelerin kullanılmasını ve geliştirilmesini gerekli kılmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı doku mühendisliği yaklaşımıyla kemik doku oluşumunu sağlayacak optimum gözenekliliğe, mekanik özelliklere ve biyoaktiviteye sahip doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonudur. Tez çalışması kapsamında dondurarak kurutma yöntemiyle metal katkılı bifazik kalsiyum fosfat (BCP)/kitosan esaslı doku iskelelerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Metal katkıları olarak insan vücudunda eser miktarlarda olmalarına rağmen, kemik doku metabolizmasında etkili olan Lantan (La) ve Samaryum (Sm) seçilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında katkısız BCP, La katkılı BCP ve Sm katkılı BCP tozları, sol-jel ve ardından 1200° C'de 3 saat ısıl işleme tabii tutulan prosesleri içeren yöntemle sentezlenmiştir. Sentezlenen tüm tozların kimyasal yapısı, fourier transform kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR), X-ışını kırınımı (XRD), enerji dağılımlı X-ışınları spektroskopisi (EDS) analizleri ile doğrulanmıştır. İkinci aşamada, sentezlenen kompozit yapıdaki tozların kitosana katılarak dondurarak kurutma yöntemiyle doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen tüm kompozit doku iskelelerinin mikroyapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) vasıtasıyla incelenmiştir.

Çalışmanın üçüncü bölümünde karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında doku iskelelerinin gözenek yapıları (boyut, şekil, birbirleri ile bağlantılı olma gibi), bozunma davranışları, şişme çalışmaları ve mekanik özellikleri incelenmiş ve bu özellikleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre doku iskelelerinin gözenek yapılarının, görülen sınırlar içinde olduğu gözlenmiştir. La ve Sm katkısı doku iskelelerinin mekanik özelliklerini iyileştirmiştir. Doku iskelelerinin biyoaktivite özelliklerini belirlemek amacıyla belirlenen sürelerde yapay vücut sıvısı (SBF) içerisinde bekletilmiştir. Yüzey karakterizasyonları ve biyoaktivite analizleri XRD, SEM ve EDS analizi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar La ve Sm ilavesinin biyoaktivite özelliklerini olumlu yönde arttırdığını doğrulamıştır.

Anahtar kelimeler: BCP, La, Sm, dondurarak kurutma, kompozit doku iskelesi

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF METAL DOPED BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE/CHITOSAN BASED BONE SCAFFOLDS

SUMMARY

Bone is a dynamic and composite structure with the ability to regenerate itself. However, in some cases where bone loss rates are high, this feature of the bone could be insufficient. In order to overcome such negative situations, interest in tissue engineering applications, which is a new approach as well as traditional treatment methods, is increasing day by day. With the development of technology, striking developments in tissue engineering have necessitated the use and development of noval materials which are biocompatible and have adequate properties for the production of scaffolds that support tissue-specific cell culture activities.

The aim of this thesis study is the production and characterization of tissue scaffolds with optimum porosity, mechanical properties and bioactivity that would be enable bone tissue formation with tissue engineering strategy. Within the scope of the thesis, metal doped biphasic calcium phosphate (BCP)/chitosan-based scaffolds were produced by freeze-drying method. Lanthanum (La) and Samarium (Sm) were chosen as metal dopants, which are effective in bone tissue metabolism, although they are in trace amounts in the human body. In the first part of the study, pure BCP, La doped BCP and Sm doped BCP powders were synthesized by a two-step process involving a sol-gel and a sintering at 1200°C for 3 h. The chemical structure of all synthesized powders was confirmed by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analyzes. In the second part, the production of tissue scaffolds was produced by freeze drying method by adding the synthesized composite powders to chitosan. The microstructures of all produced composite scaffolds were examined by scanning electron microscopy (SEM).

In the third part of the study, characterization were carried out. Within the scope of the thesis, the pore structures (size, shape, interconnectedness, etc.), degradation properties, swelling studies and mechanical properties of the scaffolds were examined and these properties were compared with each other. According to the results, it was observed that the pore structures of the scaffolds were within the observed limits. The mechanical properties of the scaffolds were improved by doping La and Sm. In order to determine the bioactivity properties of the tissue scaffolds, they were kept in stimulated body fluid (SBF) for specified periods. Surface characterizations and bioactivity analyzes were performed using XRD, SEM and EDS analysis. The results confirmed that the addition of La and Sm positively increased the bioactivity properties.

Keywords: BCP, La, Sm, freze drying, composite bone scaffold

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik kaybının yüksek miktarlarda olduğu metabolik kemik hastalıkları, enfeksiyonlar, tümörler, trafik kazaları gibi durumlarda, kemiğin kendini yenileyebilme özelliği olmasanına rağmen, kemiğin yerine geçebilecek veya kemiği destekleyecek cerrahi müdahaleler gerekir [1]. Biyouyumlu, osteointegratif ve osteokondüktif özelliklere sahip kemik otogreftleri, allogreftler ve biyomalzeme implantasyonu gibi çok sayıda operasyonel teknik mevcut olmakla birlikte, bunların önemli sınırlamaları vardır [2]. Mevcut yöntemlerin sınırlamalarını aşmak için kemik doku mühendisliği yaklaşımına olan ilgi artmıştır [3]. Kemik doku mühendisliği, dokuların gerekli işlevlerini eski haline getirmek için hücreleri ve biyomalzemeleri bir araya getirip kullanan disiplinler arası bir yaklaşımdır [4].

Bir biyomalzeme olan doku iskeleleri, kemik doku mühendisliğinin üç bileşeninden biridir. Hücre çoğalmasında ve yeni oluşan kemik yapısının büyümesine rehberlik ederek hayati işlevleri yerine getirir. Doku iskeleleri hücre dışı matrisi (ECM) taklit eder ve bulunduğu mikro çevrede uygun koşulları sağlayarak hücre ve doku büyümesini destekler [5]. Üç boyutlu ve birbirine bağlı gözeneklere sahip geçirgen yapı şeklindeki doku iskeleleri hem emilim yüzdesini artırarak hem de iyon değişimini teşvik ederek oluşan yeni dokunun içe doğru büyümesine olanak sağlar [6]. Uygun bir doku iskelesi, doğal iskelelerin yerini alacağından optimum biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerini göstermelidir. Aynı zamanda, iskeleler uygun gözenek yapısına ve stabil mekanik özelliklere sahip olmalı, hücrelerin hücre dışı sinyallere cevap vermesine izin vermelidir [7].

Kemik doku iskelelerinde kullanılan biyomalzemeler metalik, seramik, polimerik ve kompozit malzemeler olmak üzere dört gruba ayrılır. Metalik biyomalzemeler hasar görmüş kemiği değiştirmek veya destek sağlamak amacıyla diş ve ortopedide çok sıklıkla kullanılmalarına rağmen korozyona uğrayarak toksik iyon salınımı gerçekleşebilir [8].

Biyouyumlu ve biyobozunur polimerler, doku iskeleleri için yaygın olarak kullanılır. Hücre bağlanması, sabitlenmesi ve çoğalması için iyi bir destek sunarlar [9]. Kitosan doğal bir polimerdir. Biyobozunur olması, toksik özellik göstermemesi ve biyouyumlu olması doku iskelesi çalışmalarında kitosanı öne çıkarmıştır. Ayrıca kitosanın yapısında hücre dışı matrisinin önemli bir bileşeni olan glikozaminoglikanlar bulunur. Kitosan osteokondüktiftir ve yara iyileşmesini ve kemik oluşumunu hızlandırabilir [10]. Fakat kitosanın düşük mekanik özellikleri, yüksek bozunma hızı ve sulu çözeltilerde şişebilirlik gibi dezavantajları büyük bir sorun teşkil etmektedir [11]. Kalsiyum fosfat seramikler kitosana ilave edilerek bu dezavantajlar ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ve biyoaktif seramikler, kemik doku iskelesinin hücre dışı matrisinin doğasını taklit etmek için kullanılır ve ortaya doğal polimer-seramik kompozit malzemeler ortaya çıkar [12].

Kemik doku iskelelerinde en çok tercih edilen biyoseramikler Hidroksiapatit (HA) ve β-trikalsiyum fosfat (β-TCP)'tır. İnsan kemiğindeki inorganik yapının kompozisyonuna benzemeleri, yüksek basma dayanımına sahip olmaları ve osteokondüktive potansiyelleri onların doku iskeleri uygulamalarında tercih edilme sebeplerindendir [9]. Fakat HA'nin biyoaktivitesi zayıftır ve gözenekli yapıda olmasından dolayı düşük mekanik özellikleri gösterir. β-TCP ise hidroksiapatitten daha kararsız ve bozulmaya daha duyarlıdır. HA ve β-TCP'nin belli oranlarla karıştırılarak oluşturulan bifazik kalsiyum fosfat (BCP), sahip olduğu benzersiz özellikleriyle bu sınırlamaların önüne geçebilmek için kemik doku iskelelerinde kullanımı yaygınlaşmaktadır. Bifazik kalsiyum fosfat içeren doku iskelelerinin gözenekli yapısı osteojenik hücrelerinkine benzer olması nedeniyle kemik rejenerasyonunu arttırmaktadır ve hücrelerin etkilenen bölgede daha kolay yapışmasına, hareket etmesine ve çoğalmasına izin vermektedir [13]. Ancak, kitosan ya da BCP tek başına kullanıldığında, doku iskelelerinin gereksinimi olan tüm şartları yerine getirmekte güçlük çekmektedir. Bu nedenle, mevcut biyomalzemelerin mekanik ve osteoindüktif özelliklerini geliştirmek için katkılı kompozit malzemelere ihtiyaç duyulmaktadır. Kemik dokuda bulunan biyolojik kalsiyum fosfatların yapısında çeşitli iyonlar bulunmaktadır ve Ca/P oranı sentetik kalsiyum fosfatların yapısından sapma gösterir. Bu sebeple, kalsiyum fosfat esaslı malzemelerin yapısına çok çeşitli elementler eklenerek kemik doku oluşumuna etkileri araştırılmaktadır [14].

Lantan (La), Samaryum (Sm), Evropiyum (Eu), İterbiyum (Yb), Seryum (Ce) gibi nadir toprak elementleri eser miktarda kemiğin yapısında bulunmaktadır. Bu elementler kemiğin yapısında az miktarlarda olmalarına rağmen kemiğin fizikokimyasal özellikleri ve yenilenmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Son zamanlarda HA'nin kristal yapısına biyoaktivitesini ve biyouyumluluğunu arttırmak amacıyla Stronsiyum (Sr^{2+}), Magnezyum (Mg^{2+}), Manganez (Mn^{2+}), Çinko (Zn^{2+}), Seryum (Ce^{3+}) ve lantan (La^{3+}) gibi metal iyonlarıyla katkılandırılması üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır [15, 16]. La, biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan önemli bir elementtir [17]. La, sağlıklı kemik dokularında yaygın olarak bulunur ve kemikteki birikme seviyeleri tüm yaşam boyunca 1-2 kat artar [18]. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), böbrek yetmezliği ve diyaliz hastalarında hiperfosfatemi tedavisinde kullanılması için lantan karbonatı (Fosrenol ^{TM}) onaylamıştır. Hatta uzun süreli lantan karbonat kullanımıyla trabeküler kemiğin yoğunluğunu arttırdığı bu hastalarda kemik anormalliklerini iyileştirebileceği kanıtlanmıştır [19]. Yapılan bir diğer çalışmada ise saf HA ile karşılaştırıldığında, La katkılı HA'nin mekanik özelliklerinin iyileştiği, termal özelliklerinin ve biyouyumluluğunun arttığı görülmüştür [20]. Genel olarak, La^{3+} iyonları apatitte Ca'nın ikame edici iyonları olarak bilinir. La^{3+} iyonlarının HA dahil edilmesi, HA'nın biyolojik özelliklerini iyileştirir [21].

Lantanit ailesinin en önemli üyelerinden biri Samaryum (Sm)'dur. Diğer nadir toprak elementleriyle karşılaştırıldığında Sm, canlı hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda belirgin toksik ve yan etkilerinin olmaması ve daha iyi antibakteriyel özelliklere sahip olmasından dikkatleri üzerine çekmiştir [22]. Bu özelliklerine ek olarak Sm^{3+} iyonu, iyonik yarıçapı ve koordinasyon özellikleri bakımından Ca ile belirgin bir biyoinorganik benzerliğe sahiptir [23]. Sağladığı avantajlara bakıldığında, herhangi bir sınır göstermeden canlının kontrolü dışında hareket edebilen neoplazma tedavisinde ve kemik kanserlerinde ağrı tedavisinde kullanılması önerilmiştir [24]. Kemik dokusu rejenerasyonu için geliştirilen Sm katkılı cam - hidroksiapatit kompozit malzemenin osteoblastik ve antibakteriyel özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, Sm katkılı kompozitler daha iyi hücre iskeleti organizasyonu ve daha yüksek hücre proliferasyonu sergileyerek iyileştirilmiş osteoblastik davranış ve daha etkili antibakteriyel özelliklerin sağlandığı görülmüştür [25].

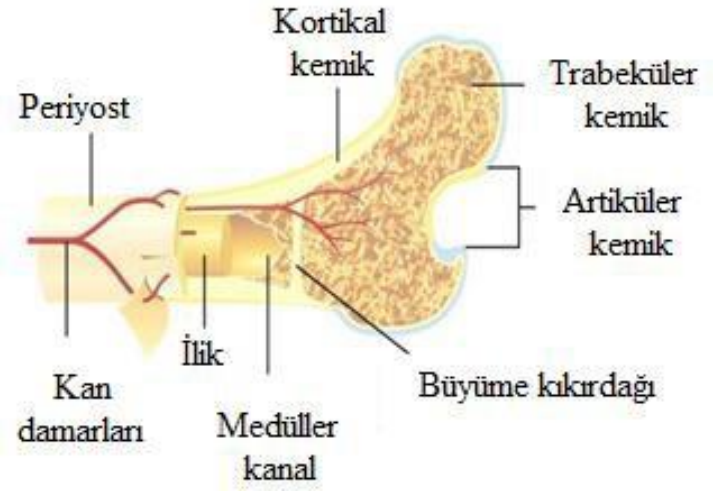
Yapılan bu tez çalışmasının amacı, kemik doku oluşumuna yardımcı ve destek olacak, biyouyumlu, metal katkılı bifazik kalsiyum fosfat/kitosan esaslı doku iskelelerinin dondurarak kurutma yöntemi kullanarak üretimi ve geleneksel malzemelerden farklı olarak alternatif kompozit kemik iskelesinin elde edilmesidir. Metal iyonları olarak Lantan (La) ve Samaryum (Sm) seçilmiştir. Bifazik kalsiyum fosfat (BCP) seramik tozu ise sol-jel yöntemi kullanılarak sentezlenip optimum sıcaklık ve zaman değerlerinde sinterlenerek hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan kitosan ve BCP belirlenen oranlarda birleştirilerek ilk aşama gerçekleştirilmiştir ve yine belirli oranlardaki metal iyonlarla takviyelendirilerek nihai olarak kompozit yapıdaki kemik doku iskelesi üretimi gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında üretilen mekanik özellikleri iyileştirilmiş açık ve düzgün gözenekli yapıdaki metal katkılı bifazik kalsiyum fosfat/kitosan esaslı doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamalarında ümit vaat eden bir malzeme olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

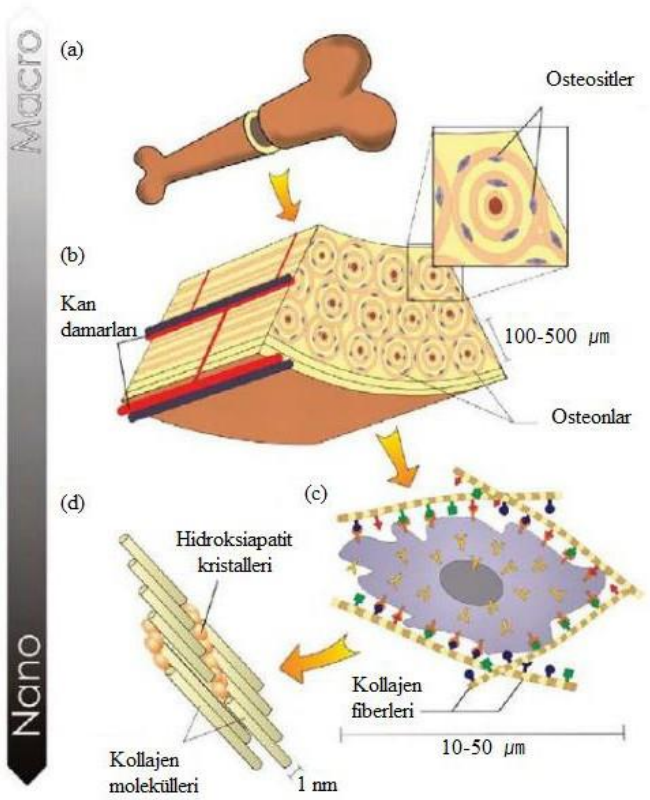
2.1 Kemik Doku ve Yapısı

Kemik insan vücudunu dış etkenlerden koruyan, hareket etmesini sağlayan bir dokudur. Fiziksel koruma görevinin yanı sıra kemik iliği üretiminin yapıldığı, kalsiyum ve fosfatın depolandığı, kendini iyileştirme kapasitesine sahip karmaşık, hiyerarşik ve dinamik bir dokudur [3, 26].

Kemik, karmaşık bir tasarıma sahip karmaşık bir organdır. Birkaç kısımdan meydana gelmektedir. İç matris, süngersi kemik, trabeküller, kırmızı kemik iliği ve damar sistemi tarafından oluşturulan gözenekli bir ağdır. Güç ve esneklik sağlamasının yanında kemiğin ağırlığını azaltarak hematopoez bölgesi olarak işlev görür. Dış matris, kortikal kemik, yüksek mekanik yüke dayanabilen, bükülme ve burulma kuvvetlerine direnebilen vasküler kanallara sahip yoğun bir bölgedir. Hücre dışı matris, kemik birikimi için bir iskele sağlar, yapıyı güçlendirir ve kemik oluşumu, büyüme, yeniden modelleme ve emilim için çok önemli olan sinyal faktörlerini barındırır. Bunlar birlikte doku rejenerasyonu için gerekli üç bileşeni oluşturur: hücre yapışması için bir osteokondüktif yapı, kemik oluşumunu yönlendirmek için osteoindüktif sinyal molekülleri ve osteojenik hücrelerin kendileri [27]. Şekil 2.1'de kemik dokunun yapısı, Şekil 2.2'de ise kemik dokusunun makro boyuttan nano boyuta doğru içeriği şematik olarak gösterilmiştir [28].



Şekil 2.1: Kemik dokunun yapısı [28].



Şekil 2.2: Kemik dokusunun makro boyuttan nano boyuta doğru içeriği [28].

Mikroskobik olarak incelendiğinde kemik dokusu oldukça karmaşık ve özelleşmiş bir bağ dokusuna sahiptir. İçerisindeki kalsiyum fosfat birikintileri sayesinde mineral bir doku özelliği kazanmıştır. Buna bağlı olarak kemiğin doğal bir kompozit malzeme olduğu söylenebilir. Mineral doku olan organik matris, yaklaşık %95'i kolajen tip I lifler ve proteoglikanlardan, %5'i ise çok miktarda kolajen olmayan proteinden meydana gelmektedir. Kalsiyum fosfat mineralleri organik matris yapısını kalsifiye etmektedir. Bu organik matriste kemiğin korunmasını sağlayan ve bu organizasyona katılan kemik hücreleri (osteoprogenitör hücreler) bulunmaktadır [29]. Kemik dokusu oluşumu, devamlılığı ve tüm yapım-yıkım işlevi üç tip hücrenin etkileşimi sayesinde gerçekleşmektedir. Osteosit, osteoblast ve osteoklast olarak adlandırılan bu hücrelerin görevi, sağlıklı bir kemik dokusunun sürekliliğini sağlamaktır. Çizelge 2.1' de hücrelerin morfolojik özellikleri ve fonksiyonları yer almaktadır [30].

Çizelge 2.1: Kemik hücresi tipleri ve fonksiyonları [30].

Hücre Tipi	Morfolojik Özellikler	Fonksiyon
Osteoblast	Kemik yüzeyinde sıkı bir tabaka halinde, polarize, kübik şeklinde	Kemik Hücre Dışı Matrisinin (ECM) birikimi, mineralizasyonun sentezi ve düzenlenmesi
Osteosit	Yıldız şeklinde, osteoblastlara oranla daha az organallere sahip	Osteoid matris kalsifikasyonu, kan-kalsiyum dengesi
Osteoklast	Polarize, çok çekirdekli	Kemik rezorbsiyonu

Kalsiyum, fosfat, hidroksil, karbonat, az oranda sitrat, sodyum, magnezyum ve demirden oluşarak homojen bir kimyasal yapısı olmayan mineralize inorganik kısmın esas yapısı Hidroksiapatit (HA)'tir. HA ile birlikte karbonat ve sitrat da taşınır. Hidroksiapatit [$Ca_{10}(PO_4)(OH)_2$] ile gösterilen iğne biçiminde kristallerdir ve kalsiyum ve fosfat iyonlarının birleşmesiyle oluşur [31-33]. Çizelge 2.2'de kemiğin yapısındaki bileşenler gösterilmektedir [31].

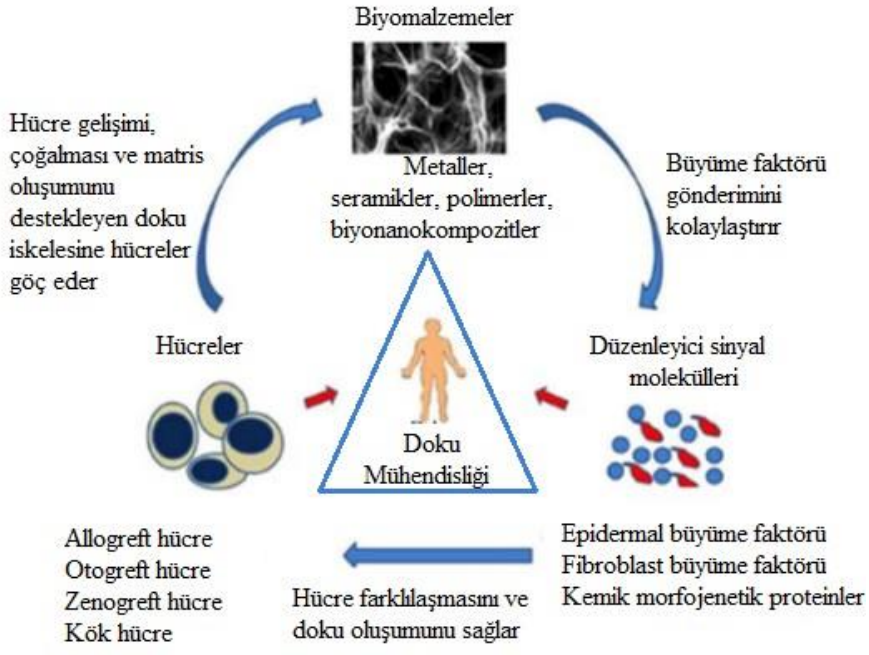
Çizelge 2.2: Kemiğin yapısındaki bileşenler [31].

İnorganik Matris	%Ağ.	Organik Matris	%Ağ.
Hidroksiapatit	~60	Kolajen	~20
Karbonat	~4	Su	~9
Sitrat	~0.9	Kolajen olmayan proteinler (osteokalsin, osteonektin, osteopontin, trombospondin, morfogenetik proteinler, sialoprotein, serum proteinleri)	~3
Sodyum	~0.7	Polisakkaritler, lipitler, sitokinler	
Magnezyum	~0.5	Birincil kemik hücreleri: osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar	
Diğerleri: Cl^-, F^-, K^+, Sr^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}			

2.2 Kemik Doku Mühendisliği

Kemik hasarları dünya çapında milyonlarca insanın muzdarip olduğu ciddi hastalıklardan birisidir. İskelet sisteminin normal ve sağlıklı fonksiyonunu sürdürülebilmesi için kemiğin uygun yapısal bütünlüğü, kompozisyonu ve şekli koruması gerekmektedir. Genetik anormallikler, yeniden şekillenmede kusur, D vitamini eksikliği, fosfor, kalsiyum ve hormonal dengesizlik gibi çeşitli faktörler kemik yapısında ve işlevinde komplikasyonlara yol açabilir. Kemik dokuları ömür boyu sürekli olarak yeniden şekillendirilir ve üstün rejeneratif potansiyele sahiptir. Fakat, büyük boyutlu kemik kusuru veya birleşik olmayan kritik kemik kırığı, cerrahi müdahale gerektirir ve kritik kusur bölgesinde kemik dokusunu eski haline getirmek için çoğunlukla otolog kemik dokusu kullanılır. Kemik greft teknikleri, kemiğin iyileştirici ve rejeneratif tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kemik greftleri, kaynaklarına göre otogreft, allogreft ve ksenograft olarak sınıflandırılır. Kemik grefti yöntemi standart tedavi yöntemi olarak kabul edilir ancak donör bölgesel ağrısı, iltihaplanma, greft reddi, hematom oluşumu ve patojen aktarımı gibi çok sayıda dezavantajları da bulunur. Kemik greftinin yanı sıra paslanmaz çelik, titanyum ve kobalt-krom alaşımlarının çeşitli metalik implantlar da yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat metalik implantlar stres koruması, tekrarlanması gereken cerrahi operasyonlar gibi belirli önemli kısıtlamalara sahiptir [34, 35]. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için yeni bir tedavi yöntemine ihtiyaç duyulmuştur ve böylelikle kemik doku mühendisliği adında yeni bir çalışma alanı doğmuştur.

Doku mühendisliğinin arkasındaki temel kavram, mühendislik ilkeleriyle birlikte vücudun doku hasarına karşı doğal biyolojik tepkisini kullanmaktır [36]. Doku mühendisliği üç temel bileşenden meydana gelmektedir. Doku mühendisliğinde kullanılan üç yaygın yaklaşım, gerekli işlevi sağlayan hücreleri değiştirmek için izole edilmiş hücrelerin veya hücre ikamelerinin kullanılması, büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi doku indükleyici maddelerin hedeflenen yerlere gönderilmesi ve üç boyutlu yapı iskelelerinde büyüyen hücrelerin implantasyonudur [37]. Şekil 2.3'te doku mühendisliğinin bileşenleri şematik olarak gösterilmiştir [38].



Şekil 2.3: Doku mühendisliği bileşenleri [38].

2.2.1 Doku iskeleleri ve özellikleri

İskele terimi, hücrelerin doku ve organları yenilemesi için uygun bir ortam sağlayan üç boyutlu (3B) biyomalzemeler için kullanılır. 3B iskeleler, dokunun eski formunu geri kazanması sürecinde, hücrelere yapısal destek sağlayarak, hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasına yardımcı olmaktadır [37, 39].

Farklı doku ve organların yenilenmesi sürecinde çok sayıda ve çeşitte biyomalzemeden farklı üretim teknikleriyle elde edilen doku iskeleri kullanılmıştır. Doku tipine bakılmaksızın, doku mühendisliğinde kullanılacak olan doku iskelesi uygun bir şekilde tasarlanırken uyulması gereken bazı önemli hususlar vardır.

Doku mühendisliği için kullanılması planlanan doku iskelenin ilk önemli kriter **biyouyumlu** olmasıdır. Hücreler yapışmalı, normal şekilde işlev görmeli, yüzeyde ve iskele boyunca göç etmeli ve yeni matris yerleştirmeden önce çoğalmaya başlamalıdır. İmplantasyondan sonra, doku iskelesinin iyileşmeyi azaltabilecek veya vücut tarafından reddine neden olabilecek kadar şiddetli bir iltihaplanmaya neden olmasını önlemek için ihmal edilebilir bir bağışıklık reaksiyonu ortaya çıkarmalıdır. Doku mühendisliğinin amacı, vücudun kendi hücrelerinin zamanla implante edilen iskelenin veya doku mühendisliği yapısının yerini almasına izin vermektir. Doku iskeleleri

kalıcı implantlar olarak tasarlanmamıştır. Bu nedenle doku iskelesi, hücrelerin kendi hücre dışı matrislerini üretmesine izin vermek için **biyolojik olarak parçalanabilir yani biyobozunur** olmalıdır. Bu bozunmanın yan ürünleri de toksik olmamalı ve diğer organlarla etkileşime girmeden vücuttan çıkabilmelidir [40].

Doku iskelelerinin mimarisi yani tasarımı da kritik bir öneme sahiptir. Çünkü kemiğin büyüme hızını etkileyerek önemli bir rol oynar. Implantasyondan sonra yapı içerisindeki hücrelerin ve bu hücrelerin sahip olduğu hücre dışı matrise gerekli olan besin geçişini sağlamak aynı zamanda atık malzemeleri çıkarmak için **doku iskelesinin birbirine bağlı ve gözenekli olması** gerekir. Gözenek boyutunun 50 μm'dan büyük olduğu, makro gözeneklilik, durumlarda hücre ve iyon taşınımında kolaylık sağladığı, gözenek boyutunun 20 μm'dan küçük olduğu, mikro gözeneklilik, durumlarda ise yüzey alanının artırılmasıyla protein emilimine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Biyolojik etkinliklerini optimize etmek için makro gözenekliliği ve mikro gözenekliliği birleştiren özel bir gözenekli mikro yapı gerekli̇dir [40-42]. Genellikle doku iskelesi dizayn edilirken % 90'ı aşan yüksek gözeneklilik tercih edilir. Bunun sebebiyse doku kültürü sırasında besinlerin yeterli difüzyonuna izin vermesi ve hücre-malzeme etkileşimlerdinde gerekli olan yüzey alanı sağlamasıdır. Fakat gözeneklilik mekanik dayanımını azalttığından, bu değer her zaman değiştirilecek dokunun mekanik ihtiyaçları ile dengelenmelidir [43].

İmplantasyon sürecinde ve sonrasında doku oluşumunun tamamlanmasına kadar olan zaman diliminde doku iskelesinin yeteri kadar güçlü olması gerekir. Doku iskelesinin vücutta yerine implante edilen kemiğin gösterdiği **mekanik özelliklere** yakın özellikler göstermesi gerekir [40, 44, 45]. Çizelge 2.3'te kortikal ve trabeküler kemiğin mekanik özellikleri verilmiştir [8].

Çizelge 2.3: Kortikal ve trabeküler kemiğin mekanik özellikleri [8].

Kortikol Kemik	**Mukavemet (MPa)**	**Young's Modülü (GPa)**
Basma Testi	219 ± 26 Boyuna 153 ± 20 Enine	14.1 – 27.6
Çekme Testi	172 ± 22 Boyuna 52 ± 8 Transverse	7.1 – 24.5
Trabeküler Kemik	**Mukavemet (MPa)**	**Young's Modülü (GPa)**
Basma Testi	1.5 – 9.3	0.1 – 0.4
Çekme Testi	1.6 – 2.42	10.4 ± 3.5

Son olarak doku iskelelerinin sahip olması gereken ve yukarıda listelenen özelliklerin de buna bağlı olduğu kriter doku iskelesinin üretileceği **biyomalzemedir.** Biyomalzeme seçimi çok önemlidir. Bunun yanı sıra **üretim tekniğ**inin önemi de bulunur.

2.3 Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyomalzemeler insan vücudunun gerçekleştirdiği fonksiyonları yerine getirebilen, destek veren ve iyileşmesini sağlayan, insan vücuduna kolayca dahil edilebilir ve özellikle de canlı dokulara biyouyumlu doğal ya da sentetik malzemeler olarak bilinir. Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün kabul ettiği tanım; bireylerin hayat kalitesini yükseltmek amacıyla vücuttaki herhangi bir doku, organ ya da fonksiyonun görevlerini belli bir zaman aralığı için veya kalıcı olarak sağlayan doğal veya yapay yoldan elde edilmiş ilaç dışındaki tüm malzeme ve malzeme kombinasyonlarıdır [46]. Avrupa Biyomalzeme Birliği Konsensus Konferansı-II'ye göreyse biyomalzeme, herhangi bir doku, organ veya vücudun işleyişini arttırmak, tedavi etmek veya değiştirmek için biyolojik sistemlerimizde öngörülen malzeme olarak tanımlamaktadır [47].

Biyomalzemeler bilim insanları tarafından birçok şekilde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmalar biyomalzemenin kimyasal kompozisyonu, biyomalzemenin kullanılma amacı, vücuttaki temas etme süresi vb. şekildeki kriterleri dikkate alınarak yapılmıştır. Çizelge 2.4'te biyomalzemelerin sınıflandırılma esasları ve sınıfları detaylı bir şekilde gösterilmiştir [48].

Çizelge 2.4: Biyomalzemelerin sınıflandırılma esasları ve biyomalzeme sınıfları [48].

Sınıflandırma Esasları	Biyomalzeme Sınıfları
Kimyasal Kompozisyon	Metalik, Seramik, Polimerik, Kompozit
Köken	Doğal, Sentetik, Hibrit (Yarı Sentetik)
Boyut	Makrometrik, Mikrometrik, Nanometrik
Canlı Dokularla Etkileşim	Biyoinert, Biyoaktif
Biyobozunabilirlik	Biyostabil, Biyobozunur
Yapısal Bütünlük	Gözenekli, Gözeneksiz
Uygulama Amacı	Teşhis, Tedavi edici, Önleyici, Onarıcı, Yenileyici
Vücutla Temas Süresi	Sınırlı (1 günden az), Uzun Süreli (1 ila 30 gün arası), Kalıcı (30 günden fazla)

Kemik doku iskelelerinde kullanılan biyomalzemeler kimyasal kompozisyonlarına göre dört ana gruba kategorilendirilir: **Metalik, seramik, polimerik ve kompozit malzemeler**dir.

2.3.1 Metalik biyomalzemeler

Metalik biyomalzemeler günümüzde özellikle de tıp alanındaki işlevsel önemi göz önüne alındığında, istenen özellikleri korurken aynı zamanda maksimum biyouyumluluk ve dayanıklılık sağlayan malzemelerdir [49]. Hasarlı kemiği değiştirmek veya kemik kusurlarını gidermek için ortopedi ve diş cerrahide en çok kullanılan çeşitli biyouyumlu metalik malzemeler: Paslanmaz çelik 316 L (ASTM F138), Co bazlı alaşımlar (esas olarak ASTM F75 ve ASTM F799) ve titanyum alaşımları, Ti-6Al-4V (ASTM F67 ve F136), Fe esaslı alaşımlar [50-56]. Metalik biyomalzemelerin ortopedi ve diş cerrahisinde kullanımı yaygın olmasına rağmen doku iskelesinde kullanılmasında bazı dezavantajları bulunur. Bunlardan ilki metallerin malzeme yüzeyinde biyolojik olarak tanınmamalarıdır, hücreler arasındaki iletişimi ve gözenekli iskele içerisinde organizasyonları zorlaştırır. Bir diğer dezavantajı ise toksik metalik iyonların veya partiküllerin korozyon ya da aşınma yoluyla olası salınımıdır, bu da biyouyumluluğu azaltan ve doku kaybına neden olan enfeksiyon ve alerjik reaksiyonlara yol açar [8].

2.3.1.1 Metal nanopartikül içeren doku iskeleleri

Biyomalzemeler arasında en yüksek mekanik dayanıma sahip olan metaller, kemik oluşumunu hızlandırmada ve kemik yenilenmesini desteklemede önemli bir rol oynarlar. Ayrıca kemiği oluşturan enzimlerin ve proteinlerin yapısal bir bileşeni olarak işlev gören, anjiyogenezi uyaran, hücre dışı matris sentezini artıran, kemik oluşumunu teşvik eden ve kemik erimesini inhibe eden enzimler için kofaktör görevi görürler. Dahası, osseointegrasyonu ve osteokondüktiviteyi teşvik etme ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler. Fakat var olan stratejilerde implantasyona bağlı olarak meydana gelen enfeksiyonları azaltılamaması hala bir problem teşkil etmektedir. Patojenik enfeksiyonların sınırlamalarının üstesinden gelmek için daha küçük boyutları ve daha büyük yüzey alanları nedeniyle, nano ölçekli metaller, çeşitli alanlarda gelişmiş antimikrobiyal özellikleri nedeniyle son yıllarda dikkatleri üzerine çekmiştir [57].

Metal nanopartiküller doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Au, Ag, Fe, Al, Ni ve Cu gibi metalik nanopartiküller yüksek antibakteriyel aktivite, düşük toksisite, kimyasal stabilite ve termal direnç gibi özellikler sergilerler. Ayrıca metal nanopartiküllerin işlevselleştirilmesinin kolaylığıyla birlikte biyomedikal yetenekleri geliştirebilir ve doku iskele imalatı sırasında katkılanarak performansları artırılabilir [58, 59]. Katkılama, bir elementin çok düşük konsantrasyonunda ana malzemeye eklenmesi olarak kabul edilir. Daha yüksek katkılı iyon içeriği, farklı kristal fazların çekirdeklenmesini teşvik etmede önemli bir rol oynar. Ana malzemenin özelliklerinin ısıl işlemin yapıldığı ortam koşullarına bağlı olarak değişebileceği anlamına gelir.

Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+}, Fe^{3+}/ Fe^{2+}, Co^{2+}/ Co^{3+} ve Mn^{2+} çoklu metabolik fonksiyonlarda yer alan ve sağlıklı kemiklerin büyümesi, gelişimi ve bakımı için gerekli olan temel eser elementlerdir. Bu katyonların farklı metabolik süreçlerdeki önemli rolü ve mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesi nedeniyle kemiğin mineral yapısına benzer özelliklere sahip Kalsiyum Fosfat seramiklerine ve biyoaktif cam malzemelere katkılandırılabilir [60]. Birçok avantaj sağlamalarına rağmen, konsantrasyonlarına bağlı olarak toksisite hala büyük bir sorundur. Özellikle de implantasyondan sonra oluşabilecek mikrobiyal enfeksiyona dayanıklı yepyeni antibakteriyel iyonlar oluşturmak gerekir. Bu nedenle var olan metal iyonlarıyla yapılan çalışmalara ek olarak kemiğin yapısında az miktarlarda olmalarına rağmen kemiğin fizikokimyasal özellikleri ve yenilenmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olan nadir toprak elementlerinin metal iyonları başta CaP seramikleriyle katkılandırılması üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır [15, 16, 61].

Nadir toprak elementleri, Lantan (Z = 57) ile Lutesyum (Z = 71) arasındaki metallerdir ve aynı zamanda lantanitler olarak da adlandırılırlar [62, 63]. Lantanitlerin sahip olduğu manyetik, optik ve katalitik özellikleri sayesinde, lantanit bileşiklerinin terapi, görüntüleme ve tanı dahil olmak üzere tıp ve nanotıp gibi farklı alanlarda kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle, insan kemiklerinde kademeli olarak biriken Ce, Gd ve Yb gibi lantanit elementleri, düşük konsantrasyonlarda kemik dokusu metabolizması üzerinde faydalı etkiler gösterir. Dahası, lantanitler hücresel metabolizma üzerinde etkili olan magnezyum, demir ve hatta kalsiyum iyonlarının yerini alabilir [60, 64]. Seryum (Ce), terbiyum (Tb), erbiyum (Er), evropiyum (Eu), lantan (La) veya samaryum (Sm)'un biyoaktif iyonlar olarak biyoseramik ve biyocamlarda katkılayıcı

olarak kullanıldığı çalışmalar gerçekleştirilmiştir ve özellikle de kemik doku iskelelerinde umut vaat eden yeni bir malzeme grubu olacağı düşünülmektedir [60].

La, insan vücudunda bulunan nadir toprak elementlerinden biridir. Eser miktarda bulunmasına rağmen kök hücre farklılaşması, doku yenilenmesi ve metabolizması gibi organizasyonlara katılarak önemli işlevleri gerçekleştirir. La, biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır . Tümör tedavisinde kullanılan X-ışını ajanlar La içerikli nanopartiküllerden oluşur. La bazlı biyoseramikler arasında, $LaPO_4$ nanopartikülleri, içsel fotolüminesans özellikleri, düşük toksisitesi ve iyi ilaç dağıtım davranışı nedeniyle özel ilgi çekmiştir [17, 65].

La, Ca gibi kimyasal afiniteye sahiptir yani kemiğin içinde veya yüzeyinde bulunur ve kemikteki birikme seviyeleri tüm yaşam boyunca 1-2 kat artar [18, 66]. Lantan esaslı bileşikler, kemik rezorpsiyonunu hızlandırmadan kemik oluşumunu uyararak kemik yoğunluğu hastalıklarını tedavi etmek için aktif maddeler olarak kullanılmaktadır. La^{3+} iyonunun konsantrasyonuna bağlı olarak kemik oluşturucu osteoblastlar üzerinde uyarıcı, osteoklast oluşumu üzerinde ise indirgeyici etkisi bulunmaktadır [67, 68]. Böbrek yetmezliği ve diyaliz hastalarında hiperfosfatemi tedavisinde kullanılan lantan karbonatın (Fosrenol TM) uzun süreli kullanımıyla birlikte trabeküler kemiğin yoğunluğunu arttırdığı, kemik anormalliklerini iyileştirebileceği kanıtlanmıştır [19]. La'nın biyouyumluluğu ve biyoaktivitesinin incelendiği çalışmalarda, La-HA kompozitlerinin daha iyi biyouyumluluğa ve daha yüksek biyoaktivite sergilediği görülmüştür [69, 70]. Bunların yanı sıra La, silikat içerikli camlara katkılandırılarak malzemenin mekanik ve fizikokimyasal özelliklerinin iyileştirilmesinde yardımcı olmaktadır [66]. Kemik tedavilerinde genel olarak lantan ve bileşikleri önerilmesine rağmen, diğer lantanitlerin kullanımı da yaygınlaşmaktadır. Bunlardan birisi de Samaryum (Sm)'dur.

Sm, nispeten ucuz ve bol bulunan lantanit ailesinin en önemli üyelerinden biridir. Sm'un oksit yapıdaki formu, osteoblast benzeri hücrelerin yapışması, çoğalması, farklılaşması ve mineralizayonunu kısa sürelerde sağladığı için daha çok kemik ikamesi olarak kullanılmaktadır. Samaryum lexidronam ise akciğer kanseri, prostat kanseri, meme kanseri ve osteosarkom ve ayrıca kemik kanserlerinde ağrı tedavisinde önerilmektedir [68, 71]. Sm^{3+} iyonları, yüksek yoğunluklu optik depolamada kullanımları, mükemmel optik ve antibakteriyel özellikleri nedeniyle analiz edilmesi

gereken iyonlardan biridir [72]. Sm^{3+} iyonları, iyonik yarıçapı ve koordinasyon özellikleri bakımından Ca ile belirgin bir biyoinorganik benzerliğe sahiptir ve sergiledikleri yüksek antimikrobiyal aktivite özellikleri onları kemik doku iskelelerinde daha fazla kullanılmalarının önünü açmıştır [23, 73]. Kemik dokusu rejenerasyonu için geliştirilen Sm katkılı cam - hidroksiapatit kompozit malzemenin osteoblastik ve antibakteriyel özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, Sm katkılı kompozitler daha iyi hücre iskeleti organizasyonu ve daha yüksek hücre proliferasyonu göstererek iyileştirilmiş osteoblastik davranış ve daha etkili antibakteriyel özelliklerin sağlandığı görülmüştür [25].

2.3.2 Polimerik biyomalzemeler

Polimer biyomalzemeler bir önceki bölümde sıralanan metalik biyomalzemelere alternatif olarak, ideal olduğuna inanılan, biyouyumlulukları, tasarım esneklikleri, fonksiyonel grupların mevcudiyeti, yüzey modifiye edilebilirlikleri, hafiflikleri ve sünek yapıları nedeniyle doku iskelesi tasarımında çok sık kullanılan malzemelerdendir [30, 31]. Doğal ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılırlar [35, 74, 75].

Doğal polimerler, doku iskelesi için gerekli olan biyouyumluluğa ve biyobozunurluğa sahiptir. Kontrol edilebilir olması yani mekanik özelliklerin, gözenekliliğin, polimer konsantrasyonlarının ve polimerizasyon koşullarının değiştirilebilmesi veya çeşitli fonksiyonel grupların eklenmesi doğal polimerlere olan ilgiyi arttırmaktadır. Ayrıca biyoaktivite de kimyasalların, proteinlerin, peptitlerin ve hücrelerin eklenmesiyle de kontrol edilebilir. Kemik doku mühendisliği amacıyla en çok çalışılan doğal polimerler, kolajen / jelatin, kitosan, ipek, aljinat, hyaluronik asit ve peptitlerdir [76]. Fakat doğal polimerlerin mekanik özellikleri zayıf olduğundan kısıtlı kullanım alanlarına sahiptir [39, 45].

Sentetik polimerler, in vivo ve in vitro koşullarında yavaş bozunma hızına sahiptir, böylece maruz kaldıkları koşullar göz önüne alındığında varlıkları daha uzun ömürlü olur. Biyouyumluluğun geliştirilmesi için mükemmel mekanik ve termal özelliklere sahip oldukları da bilinmektedir [40]. Sentetik polimerlere Polilaktik Asit (PLA), Poliglikolid Asit (PGA) ve Polilaktik-Ko-Glikolik Asit (PLGA) örnek verilebilir [74]. Birçok doku mühendisliği uygulaması için, tek bir polimer yeterli fiziksel ya da

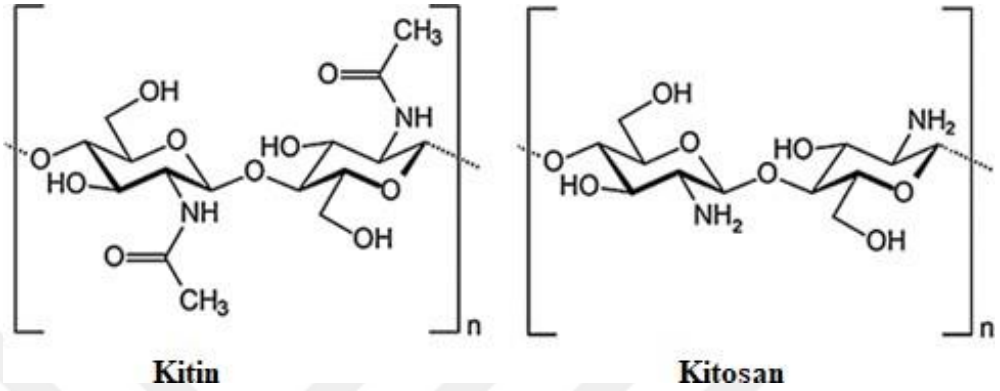
biyolojik özelliği sunamayabilir. Bu nedenle; değişik kimyasal ve biyolojik özelliğe sahip çoklu monomerler sentezlenebilir ya da bir doku iskelesi yapımında birden çok monomerin karışımı ya da katkısı gerekebilir [75]. Çizelge 2.5'te doku iskelesinde kullanılan bazı polimerik biyomalzemeler ve özellikleri sıralanmıştır [30].

Çizelge 2.5: Doku iskelelerinde kullanılan bazı polimerik biyomalzemeler ve özellikleri [30].

Malzeme	**Köken**	**Özellikler**
Kolajen	Doğal	Düşük bağışıklık tepkisi gösterir. Hücre yapışması için iyi substrattır. Kemotaktik Düşük mekanik özelliklere sahip iskelelerde kullanılır.
Fibrin	Doğal	Hücre göçünü ve damarlanmayı destekler Osteokondüksiyonu teşvik eder Genellikle iskelelerde hücre tohumlama için hücre taşıyıcı olarak kullanılır.
Kitosan	Doğal	Hemostatik Osteokondüksiyonu ve yara iyileşmesini destekler
Poli(α-hidroksi asitler)	Sentetik	Trikarboksilik asit döngüsüne giren veya alternatif olarak (örneğin glikolik asit) asidik yan ürünler (örn. Laktik asit, glikolik asit) idrarla atılır. İmplantasyon sahasının çevresindeki alanda biyouyumluluk ve sitotoksisite ile ilgili sorunlar ortaya çıkarabilir.
Poli (anhidritler)	Sentetik	Esas olarak ilaç dağıtım taşıyıcıları olarak geliştirilmiştir. Biyouyumludur. Hem endosteal hem de kortikal kemik rejenerasyonunu destekler.

Doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci polisakkarit olan **kitosan** karides, yengeç ve ıstakoz gibi kabukluların dış iskeletinde bulunan doğrusal, katyonik ve doğal bir polimerdir. Kitinin deasetillenmiş formu olan kitosan (CS), değişken sayıda rastgele dağılmış N-asetil-d-glukozamin (NAG) gruplarına sahip β (1-4) glikosidik bağlara bağlı D-glukaozaminlerden oluşur. Deasetilasyon derecesi hem NAG hem de D-glukozamin birimlerinin toplamı molar oranını temsil eder. Deasetilasyon derecesi, kitosanın kristalliğini etkiler ve %100 deasetillenmiş kitosan oldukça kristaldir [29, 77-80]. Şekil 2.4'te kitin ve kitosanın yapısı gösterilmiştir. Birincil amino grubunun

varlığı, biyouyumluluk, biyobozunur, susuz ortamda çözünürlük, hemostatik özellik, antibakteriyel aktivite ve yapışkanlık gibi kitosanlara temel özellikler kazandırır. Hidroksil gruplarının varlığından dolayı kitosan, polar gruplar ile etkili bir şekilde hidrojen bağı oluşturabilir [81].



Şekil 2.4: Kitin ve kitosanın yapısı [81].

Depolimerizasyon işleminden sonra kitosan, üstün anti-mikrobiyal özelliklere sahip biyoaktif kito-oligosakkaritler ve vücutta metabolize edilen ya da atılacak olan monomerik ürünlere (glukozamin) ayrılır. Glikozaminoglikanlar ise hücre dışı matriksinin kolajen lifleriyle etkileşime giren ve hücre-hücre yapışmasında hayati bir rol oynayan bileşenlerinden biridir. Yapısal benzerliğe sahip biyobozunur CS vücuttaki neredeyse tüm dokularla mükemmel biyouyumluluğa sahiptir. Kitosan hem gerekli olan osteokondüktiviteyi hem de azami miktardaki osteoindüktif özellik sergiler. Osteoblast hücrelerinin, mezenkimal hücrelerin proliferasyonunu ve in vivo neovaskülarizasyonu indükler. Ortopedik uygulamalar için süngerler, fiberler, filmler ve diğer karmaşık yapılar gibi çeşitli geometrilerde CS hazırlanır. Böylece CS, doku mühendisliği uygulamaları için gerekli olan özelliklerin çoğunu karşılar. Ayrıca, kitosan kolayca işlenebilir ve çeşitli iskele üretim teknolojisi ile çeşitli mikro yapı tiplerinde doku iskelesi imal etmek için kullanılabilir. Kitosanın çok yönlü biyopolimer malzeme olmasına rağmen, sahip olduğu mekanik özelliklerinin yetersizliği, yüksek hidrofobikliği ve biyolojik aktivite eksikliğinden kaynaklanan zayıf hücresel afinitesi gibi nedenlerden dolayı kullanımı kısıtlıdır [79-85].

2.3.2.1 Kitosan esaslı doku iskeleleri

Doğal ve çok yönlü bir biyomalzeme olan kitosan, doğal ve yenilebilir kaynak olan kabukluların kabuklarından üretilir. Birçok sentetik polimerin aksine, CS hücre yapışmasını ve çoğalmasını teşvik eden hidrofilik bir yüzeye sahiptir ve bozunduğunda çevresine verdiği ürünler toksik değildir. CS, kemik yapıcı osteoblast hücrelerinin bağlanmasını, çoğalmasını ve in vitro mineralize kemik matrisinin oluşumunu desteklemesi ve üzerinde bulunan reaktif birincil aminler ve birincil ve ikincil hidroksil grupları, kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için kitosanın optimize edilmesinde önemli olabilecek yan grupların, peptitlerin veya amino asitlerin eklenmesine izin verdiği için doku iskelesi malzemesi olarak dikkatleri üzerine çekmiştir [86].

Gözeneklilik, kemik dokusu gelişimi için spesifik yüzey alanını arttırmada önemli bir değişkendir ve gözenekli iskeleler, doku ve malzemenin füzyonunu teşvik ederek kemiğin rejenerasyonunu destekler [87]. Hücrelerin doku iskelesine bağlanması gözenek boyutuna bağlıdır ve gözeneklerin çok küçük veya çok büyük olması sorun teşkil etmektedir. Eğer gözenek boyutu çok küçükse sınırlı hücre geçirgenliğine ve iskelenin kenarlarında kapsül oluşumuna sebep olur. Tam tersi gözenekler çok büyükse, sınırlı spesifik alana neden olarak hücrenin bağlanması için gerekli yoğunluğu azaltır. Bu nedenle doku iskelelerinde optimal gözenek boyutunu ayarlamak çok önemlidir. Kitosan sahip olduğu gözenekli mimari yapısı çok çeşitli geometrilerde ve ayarlanabilir gözenek boyutları sayesinde çeşitli gözenek yapılarına sahip 3B iskeleler oluşturmak üzere tasarlanıp kullanılabilir ve kemik dokusu rejenerasyonu için uygulanabilir. Kitosanın sahip olduğu bu avantaj kemik doku mühendisliği uygulamalarında özellikle de doku iskelelerindeki rolünü arttırmıştır [88-93].

Kitosanın baz polimer olarak kullanılarak üretildiği doku iskelelerinde, yüksek bozunma hızı, düşük mekanik özellikler ve düşük biyoaktivite göstermesi gibi sebeplerden dolayı uygun optimal özellikleri elde etmek gerekir. Ayrıca saf kitosan, mezenkimal kök hücreler gibi osteojenik hücrelerin bağlanması ve çoğalması için uygundur fakat kemik oluşumunu indüklemez veya kemikle bir bağ oluşturmaz. Kitosan esaslı iskelelerde bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek ve geliştirmek için kopolimerler, nanopartiküller ve fonksiyonel grup modifikasyonları eklenir [94].

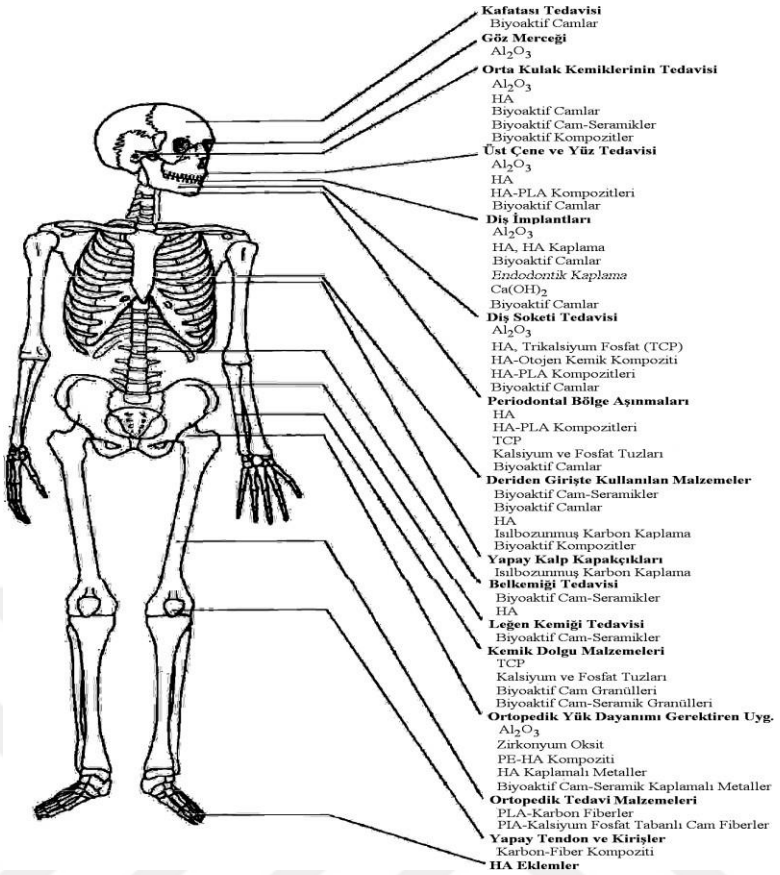
Bu nedenle, kitosan esaslı doku iskelelerin biyoaktif seramik malzemelerle bir araya getirilmesini, bu iskelelerinin hem mekanik özelliklerini hem de biyoaktivitesini geliştirilerek, sağlayan bir strateji ortaya çıkmıştır. Kalsiyum fosfatlar (CaP), biyoaktiftir, yani kemiğe bağlanırlar ve osteokondüktiftir. Ayrıca kimyasal bileşimde kemiğin mineral fazına benzedikleri için kemik doku uygulamalarında sıklıkla kullanılan biyoseramiklerdir . Hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP), bifazik kalsiyum fosfat (BCP), oktakalsiyum fosfat (OCP) ve dikalsiyum fosfat dehidrat gibi CaP'ler, kitosan esaslı doku iskeleleri için biyoaktif alanlar sağlarlar [86, 92, 95].

2.3.3 Biyoseramikler

Biyomalzeme alanındaki gelişmeler diğer malzemelere olduğu gibi seramik malzemelere olan ilgiyi de arttırmıştır. Bilinen geleneksel seramiklerden ayrılan **biyoseramikler** sağlık endüstrisinin önemli bir parçası olmaya başlamışlardır. Biyoseramikler, en geniş tanımıyla, biyomedikal alanda özellikle dental ve iskele onarımı için kullanılan seramik malzemelerdir [55, 96]. Biyoseramikleri doku ile etkileşimine göre sınıflandırılırsa bunlardan biri biyoinert seramiklerdir. Biyoinert seramikler, canlı dokuda herhangi bir değişiklik göstermeden doku ile mekanik bir bağ oluşturur. Bir diğer çeşidi ise biyoaktif seramiklerdir. Biyoaktif seramikler, biyoinert seramiklerin aksine kemikle ya da canlı organizmanın yumuşak dokusu ile kimyasal bağ yapma özelliği gösterirler. Son olarak biyobozunur seramikler, biyolojik olarak bozunarak zamanla doku ile yer değiştirirler. Çizelge 2.6'da biyoseramikler sınıflandırılarak örnekleri gösterilmiştir. Şekil 2.5'te ise biyoseramiklerin insan vücudundaki kullanım alanları görülmektedir [97].

Çizelge 2.6: Biyoseramiklerin sınıflandırılması ve örnekleri [97].

Biyoseramik tipi	Doku ile Etkileşimi	Örnek
Biyoinert	Mekanik bağ	Al, Zr, Ti oksitler
Biyoaktif	Kimyasal bağ	HA, biyoaktif cam, cam seramikler
Biyobozunur	Yer değiştirme	TCP (Trikalsiyum fosfat)



Şekil 2.5: Biyoseramiklerin insan vücudundaki kullanım alanları [97].

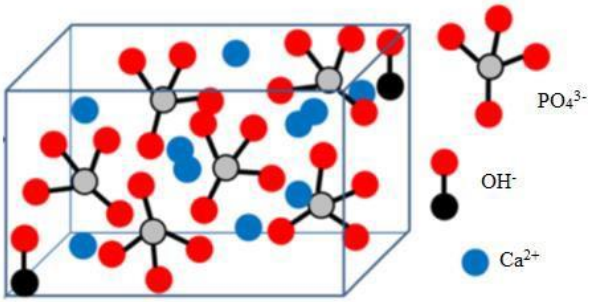
Biyoseramikler doku etkileşimlerine göre biyoaktif, biyoinert ve biyobozunur olarak sınıflandırıldığı gibi kompozisyonlarına göre de sınıflandırılır. Bunlar kalsiyum fosfat seramikleri, oksit seramikler ve silikat seramikleridir [98].

Kalsiyum fosfat seramikler osteoblastların yapışmasını ya da çoğalmasını ve yeni kemik oluşumunu destekleyen biyoaktif malzemelerdir [99]. Kemik dokunun ağırlıkça yaklaşık olarak %70'lik kısmı hidroksiapatit olduğu düşünülürse, üretilen kalsiyum fosfat seramiklerin yapısının kemik dokuya benzer olması bu alandaki biyouyumluluk, toksik etki, emilim, kolay üretim-maliyet, sterilizasyon, gerekli mekanik özellikler gibi sağlaması gereken parametreleri karşılamaktadır [100, 101]. Çizelge 2.7'de kalsiyum fosfat seramikler ve yoğunlukları verilmiştir [101].

Çizelge 2.7: Kalsiyum fosfat seramikler ve yoğunlukları [101].

Bileşen İsmi	Kısaltma	Ca/P oranı	Kimyasal Formül	Yoğunluk (g/cm^3)
Monokalsiyum Fosfat	MPCP	0,5	$Ca(H_2PO_4).H_2O$	2,23
Dikalsiyum Fosfat	DCDP	1	$CaHPO_4.H_2O$	2,32
α-Trikalsiyum Fosfat	α-TCP	1,5	α-Ca_3PO_4	2,86
β-Trikalsiyum Fosfat	β-TCP	1,5	β-Ca_3PO_4	3,08
Tetrakalsiyum Fosfat	TTCP	2	$Ca_4(PO_4)_2O$	3,05
Hidroksiapatit	HA	1,67	$Ca_{10}(HPO_4)_6.(OH)_2$	3,16

Hidroksiapatit (HA), ağırlıkça yaklaşık % 70 ile kemiğin inorganik kısmının birincil fazıdır. Hidroksil gruplarının (-OH-) varlığından dolayı HA olarak adlandırılır [97]. Hidroksiapatitin genel formülü ($Ca_{10}(HPO_4)_6.(OH)_2$) şeklinde gösterilmektedir. Hidroksiapatitte kalsiyum ve fosfor sitokiyometrik oranı 1,67'dir. Beevers ve McIntyre tarafından, hidroksiapatiti oluşturan atomların tam anlamıyla yerlerini belli eden kristal yapısı, bir mineralden belirlenmiştir. Kay tarafından yapılan daha sonraki çalışmalarda, sentetik hidroksiapatit kullanılarak düzeltilmiştir [45, 102]. Hekzagonal yapıdaki HA'in, kafes parametreleri a=0.9432 nm c=0.6881 nm uzunluğundadır. Gözeneksiz yapıdaki yoğunluğu yaklaşık olarak 3.16 g/cm^3 ve yine yaklaşık olarak mikro sertliği 500-600 HV'dir ve ayrıca 100-200 MPa arasında basma mukavemetine sahiptir [103]. Şekil 2.6'da hidroksiapatitin kristal yapısı gösterilmiştir [100].



Şekil 2.6: Hidroksiapatitin kristal yapısı [100].

HA kimyasal olarak sentezlenebilir veya doğal kaynaklardan elde edilebilir. HA, mekanokimyasal yöntemi, yaş kimyasal çökeltme, hidroliz, sol-jel, hidrotermal, emülsiyon, sonokimyasal ve yüksek sıcaklık gerektiren yanma ve piroliz dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle üretilebilir. Doğal hidroksiapatit ise genellikle sığır, deve, at, balık kemiği, midye, istiridye, yumurta kabuğu ve deniz kabuğu gibi doğal kaynaklardan veya kireç taşı gibi minerallerden üretilebilir [104]. Sahip olduğu biyouyumluluk, biyoaktiflik, toksik olmama gibi özellikler sayesinde kemik doku mühendisliğinde sıkça kullanılan HA, ortopedik, diş implantları, spinal füzyon ve kemik kusurlarının tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat çözünme hızının yavaşlığı, düşük mekanik özelliklere sahip olması kemik doku uygulamalarında kullanımını zorlaştırmaktadır [105, 106].

Kemik doku uygulamalarında kullanılan bir diğer kalsiyum fosfat seramiği ise **Beta-Trikalsiyum Fosfattır.** Genel formülü **β-TCP (β-$Ca_3(PO_4)_2$)** şeklinde gösterilir. Doku iskelelerinde çok sık tercih edilen ve biyoaktif bir seramik olan β-TCP, iyi biyouyumluluğa, osteokondüktiviteye ve biyobozunur özelliklere sahiptir. İnsan kemiğinin yapısındaki bileşenlere benzer özellikler gösterir ve böylelikle hücrelerin kemik dokuda gelişimine yardımcı olur.β-TCP dökme, granül, toz veya kaplama formunda üretilebilir. HA ile karşılaştırıldığında β-TCP biyobozunma hızı yüksektir. Fakat β-TCP biyobozunur olmasına rağmen, bozunma kinetikleri yavaş olma eğilimi gösterir. Bunun yanı sıra düşük mekanik özelliklere sahip doku iskelerinde kullanımını sınırlamaktadır [45, 107-109].

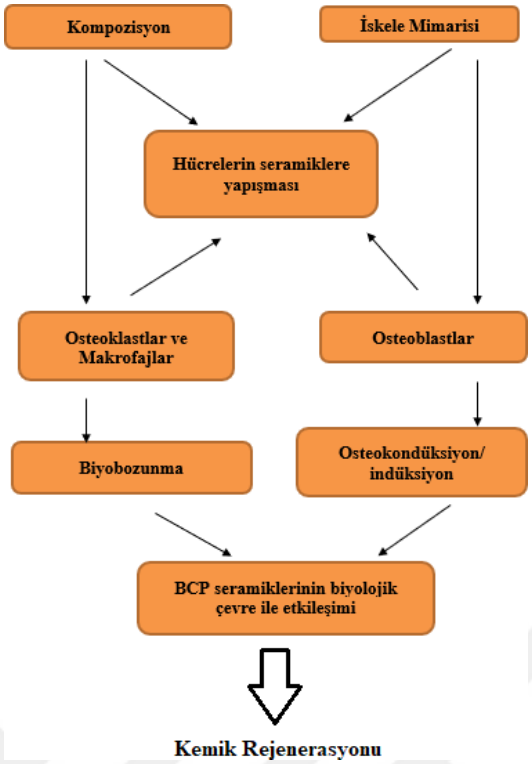
HA ve β-TCP hem iyi biyouyumluluk ve osteokondüktiviteye hem de kemiğin mineral bileşenlerine benzer yapıya ve kimyasına sahip olmalarından dolayı kalsiyum fosfat seramikler arasından en çok tercih edilen biyoseramiklerdir. Ama HA'in daha yavaş çözünme süreci ve β-TCP'nin oldukça hızlı çözünme hızı, bu tür uygulamalar için büyük bir engel teşkil etmektedir [13, 110]. Bileşimsel gereksinimlere ek olarak, doku iskeleleri gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır. Doku iskelelerinin gereksinimlerinden olan gözenekliliği HA ve β-TCP biyoseramikleri karşılar, ancak bir malzeme genellikle gözenekliliği arttıkça mekanik özellikleri zayıflar ve bu da iskelelerin geliştirilmesinde büyük bir zorluk oluşturur. Doğal kırılganlıkları nedeniyle, çok düşük mukavemet ve tokluğa sahiptir. Bu nedenle olumlu biyolojik özelliklerine rağmen, bu seramik malzemelerin zayıf mekanik özellikleri, doku iskelelerinde

kullanımını kısıtlamaktadır [111]. Bu geleneksel malzemeler gereken ihtiyaçları karşılayamaz hale geldiğinden yeni malzemelerin keşfi kaçınılmaz olmuştur. Bu malzemelerden biri **Bifazik Kalsiyum Fosfat'tır.**

2.3.3.1 Bifazik kalsiyum fosfat (BCP)

Bifazik Kalsiyum Fosfat (BCP), 1985 yılında Biyomalzemeler Derneği'nin 11. Olağan toplantısında ilk kez tanımlanmıştır. Aslında ilk kez 1975'te Nery ve arkadaşları tarafından hazırlanan karışım yanlış bir tanımlamayla 'trikalsiyum fosfat' olarak adlandırıldı. Daha sonra 1986'da bu yazarlar tarafından düzeltildi ve 1988'de LeGeros tarafından kabul edildi [112].

HA vücut ortamında daha kararlı, β-TCP ise daha çözünür bir yapıya sahiptir. Bu nedenle, daha kararlı bir faz ile daha çözünür bir faz arasında denge sağlanarak daha iyi biyoemilebilirlik ve osseointegrasyon malzemesi olan BCP'ler ortaya çıkmıştır. BCP'ler farklı oranlarda HA ve β-TCP karışımından oluşan bir kalsiyum fosfat grubu biyoseramik malzemelerdir [111, 113]. Bu iki kalsiyum fosfat fazının farklı çözünürlüğe sahip kombinasyonları bulundukları doku iskeleleri içerisinde bozunma kinetiğinin in vitro ve in vivo olarak ayarlanabilmesine olanak sağlar [114]. BCP'lerde HA/β-TCP oranını kontrol ederek, sadece BCP'lerin emilim oranını değil, aynı zamanda kemik hücrelerinin yakınındaki iyonların salımını da kontrol etmek ve BCP'lerin biyolojik özelliklerini modüle etmek mümkündür. Dikkat edilmesi gereken ise HA/β-TCP oranının BCP'lerin biyoaktivitesi üzerindeki etkisidir. BCP sentezi sırasında sinterlemede HA'nın β-TCP'ye olası termal ayrışması söz konusudur [85]. Sağlanan optimal dengeyle birlikte (HA / β-TCP), biyolojik ortamda kalsiyum (Ca^{2+}) ve fosfat (PO_4^{3-}) iyonlarının kademeli olarak çözünmesini ve yeni kemiğin oluşması gerçekleşir [115]. Şekil 2.7'de BCP seramikleri ile biyolojik çevre arasındaki dinamik ve karmaşık etkileşimi özetlemektedir. BCP seramiklerinin kimyasal bileşimi, iskele mimarisi, kemik oluşum hücreleri ve osteoklastlar dahil olmak üzere kemik hücrelerinin yapışmasını kontrol etmek için gerekli temel parametrelerdir. Bu yapışık hücrelerin eşzamanlı etkisi, BCP'lerin biyolojik bozunma sürecine ve osteokondüksiyon / indüksiyon özelliklerine aracılık eder [112].



Şekil 2.7: BCP seramiklerinin biyolojik çevreyle dinamik ve karmaşık etkileşimi [112].

BCP biyoseramikleri genellikle BCP tozları tarafından porojenik işlemle sentezlenir. BCP tozlarının hazırlanması için, Kalsiyumdan yoksun hidroksiapatit (CDHA) ($(Ca_{10-x}M_x(PO_4)_{6-x}(HPO_4)_x(OH)_{2-x}$, Ca/P<1.67) önce yaş kimyasal veya çökeltme yöntemiyle sentezlenir ve sonraki adımda ise daha fazla kalsinasyon uygulanarak HA'ya ve β-TCP'ye ayrıştırılır. Diğer hazırlama yöntemleri, Dikalsiyum fosfat dehidrat (DCPD, $CaHPO_4 \cdot 2H_20$) ve $CaCO_3$, Monokalsiyum fosfat monohidrat(MCPM, $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$) ve $CaCO_3$ arasındaki yüksek sıcaklıklardaki katı hal reaksiyonundan ve ardından 700 ºC veya üzeri sıcaklıkta sinterlenmesi sonucu elde edilmektedir. BCP'nin oluşum reaksiyonu şu şekildedir:

$$(Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(HPO_4)_x(OH)_{2-x} \rightarrow (1-x)Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 3xCa_3(PO_4)_2 + xH_20$$

BCP tozları ayrıca sentetik HA ve β-TCP'nin çeşitli oranlarda mekanik olarak karıştırılması ve ardından kalsinasyonu ile üretilebilir [110, 112]. BCP'nin doğal kaynaklardan sentezlenerek üretilmesine yönelik çalışmalar yürütülmektedir [116]. Piccirillo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada morina ve kılıç balığının kemiklerinin

toz haline getirilip 1000 ºC'de kalsine edilerek büyük bir kısmı β-TCP içeren bifazik kalsiyum fosfat tozlarını elde etmişlerdir [117].

BCP'ler yeterli bozunmaya, mükemmel biyouyumluluğa, osteokondüktiviteye ve hatta osteoindüktiviteye sahip olduklarından doku iskelesi malzemesi olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Fakat diğer kalsiyum fosfat seramiklerde olduğu gibi dayanımları yüke maruz kalan uygulamalarda yetersizdir. BCP iskelelerinin mekanik özelliklerini iyileştirmek için iskelelerin polikaprolakton (PCL)/HA veya PCL/biyocam gibi nanokompozit bazlı polimerlerle kaplanması veya metal oksitler gibi ikincil fazların eklenmesi dahil olmak üzere farklı yöntemler geliştirilmiştir [118].

2.4 Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Kemik doku mühendisliği malzeme bilimi, mühendislik tasarımı ve biyoloji ilkelerini birleştiren, hücre dışı matrisine en yakın özelliklere sahip ve hasar görmüş doku ve hücreleri koruyan malzemeleri üreten ve geliştirmeyi amaçlayan disiplinler arası bir alandır. Malzemeler in vivo kullanılmadan önce in vitro testlere tabii tutularak hücrelerin fonksiyonel doku oluşturmak amacıyla yeniden düzenlenmesini teşvik edip edemeyeceği kontrol edilir. Doku mühendisliği ile ilgili bilgiler zamanla arttıkça iskelelerin biyolojik özelliklerine daha fazla dikkat çekilmiştir. Yaygın olarak kullanılan iskelelerin bir kısmının, morfogenez, farklılaşma, proliferasyon ve yapışma gibi kritik hücresel fonksiyonları kontrol eden ECM'nin mikro çevresini yeterince özetleyemediği fark edilmiştir. Bu yüzden farklı dokular için iskeleler geliştirilirken malzemenin üç yönüne odaklanılması gerekir: Biyouyumluluk, farklı dokulara uygun mekanik özellikler ile biyobozunurluk. Belirtilen özelliklere ulaşılması için çeşitli doku iskelesi üretim yöntemleri geliştirilmiştir. Elektroeğirme, çözücü uzaklaştırma/parçacık özütleme yöntemi, tuz liçi, faz ayrımı, gaz köpüklendirme, 3 boyutlu baskılama, mikroakışkan tekniği ve dondurarak kurutma başlıca doku iskelesi üretim yöntemleridir [119, 120]. Çizelge 2.8'de bazı doku iskelesi üretim yöntemleri, bu yöntemlerin avantaj ve dezavantarı ve gözenek boyutları ve gözeneklilik oranları gösterilmiştir [121].

Çizelge 2.8: Doku iskelesi üretim yöntemleri, bu yöntemlerin avantaj ve dezavantarı, gözenek boyutları ve gözeneklilik oranları [121].

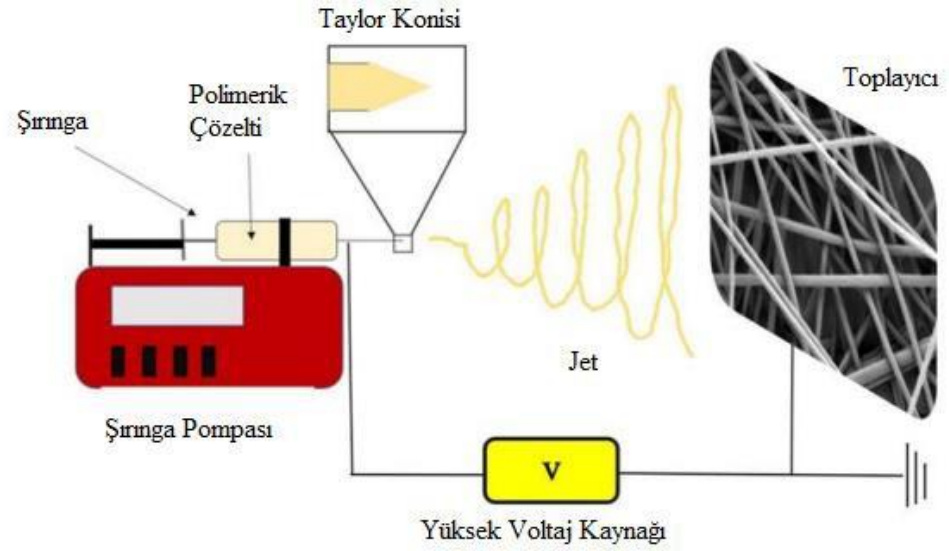
Üretim Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları	Gözenek Boyutu(µm)	Gözeneklilik (%)
Dondurarak Kurutma	Yüksek gözenekli yapı Yüksek bağlantılı gözenekler Gözenek boyutunun dondurma ile kontrolü	Küçük gözenek çapı	Ortalama 15-35 µm	<90
Eriyik Kalıplama	Makro yapının kontrolü Gözeneklilik ve gözenek boyutunun bağımsız kontrolü	Amorf olmayan polimerler için yüksek işleme sıcaklığı	50-500 µm	<80
Membran Laminasyonu	Makro yapının kontrolü Gözeneklilik ve gözenek boyutunun bağımsız kontrolü	Düşük mekanik özellik Çözücünün uzaklaştırılması Üretim sürecinin uzunluğu Gözenekler arası zayıf bağlantı	30-300 µm	<85
Faz Ayırımı	Biyoaktif ajanlarla etkileşime uygun Yüksek gözenekli yapı Ayarlanabilir şekil, büyüklük ve mekanik özellik	Mikro yapının kontrolünde yetersiz olması Düşük üretim verimi Farklı boyutlarda gözenek elde etmek için elverişsiz olması Çözücü uzaklaştırma problemi	<200 µm	<97

Çizelge 2.8 (devam): Doku iskelesi üretim yöntemleri, bu yöntemlerin avantaj ve dezavantarı, gözenek boyutları ve gözeneklilik oranları [121].

Üretim Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları	Gözenek Boyutu(µm)	Gözeneklilik (%)
Üç Boyutlu Baskılama Tekniği	Yüksek gözeneklilik Kolay işleme Yüksek yüzey alanı, hacim oranı Gözenekler arası yüksek bağlantı Farklı polimerleri işleyebilme	Toksik organik çözücülerin kullanımı Küçük gözenek çapı Zayıf mekanik dayanım	45-150 µm	<60
Elektroeğirme	Düşük maliyet Ayarlanabilir şekil, büyüklük ve mekanik özellik Çok çeşitli polimer kullanabilme özelliği	Organik çözücülerin kullanılması Üç boyutlu yapıların üretiminde elverişsiz olması		
Çözücü Dökümü/ Parçacık Uzaklaştırma	Farklı boyutlarda gözenek çapı Yüksek gözeneklilik Ayarlanabilir kristalinite	Düşük mekanik özellik Porojen ve çözücülerin yeterince uzaklaşmaması Sınırlı membran kalınlığı	30-300 µm	20-50
Eriterek Birikim Modellemesi (FDM)	Yüksek gözeneklilik Yüksek yüzey alanı, hacim oranı	Yüksek işleme sıcaklığı Sınırlı sayıda polimer için uygun Farklı yönlerde gözenek oluşturma kısıtlı	>150 µm	48-77

2.4.1 Elektroeğirme

Elektroeğirme yöntemi mikrometre ya da nanometre boyutunda biyouyumlu ipliksi yapıdaki doku iskelesi elde edebilmek için geliştirilen bir sistemdir [122]. Elektroeğirme elektrik alan içerisinde yüklenmiş polimer çözeltisinin topraklanmış bir toplayıcı levhada biriktirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Şekil 2.8'de elektroeğirme sisteminin bileşenleri gösterilmektedir [123].

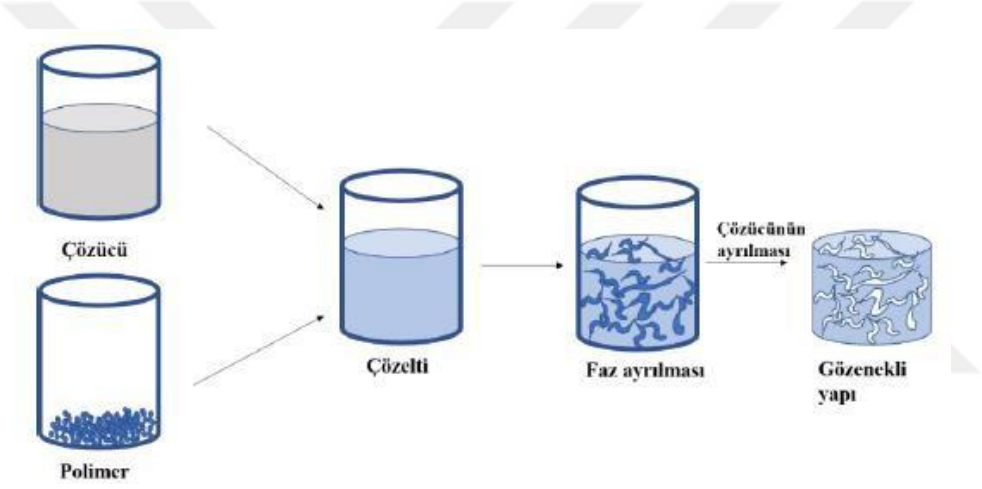


Şekil 2.8: Elektroeğirme sisteminin bileşenleri [123].

Şırınga içindeki polimerik çözelti veya eriyiği, şırınga pompası yardımıyla uç kısma doğru itilir. Şırınganın ucundaki polimerik çözelti ile karşısında bulunan toplayıcı arasına gerilim uygulanarak farklı yüklere sahip olmaları sağlanır. Bu sırada uç kısımda elektriksel gerilme, yüzey gerilmesi ve yerçekimi kuvvetleri bulunur ve bu kuvvetler birbirini dengeleyerek Taylor konisini oluşur. Oluşan polimerik damlacık elektrikle yüklenir. Belirli bir voltaj değerinin üstüne çıkıldığında koninin ucundan yüklü polimer jeti fışkırır. Toplayıcıya doğru uzamaya başlayan polimer jeti çözücünün buharlaşmasıyla katılaşarak toplayıcıda lif şeklini alır. Elektoreğrilme yöntemiyle üretilen doku iskeleleri poroz fiber yapısına ve yüksek yüzey alanına sahiptirler. Bu özellikler doku iskelelerinin bulunduğu ortamdaki hücreler için gerekli olan besin /artık alışverişinin yapılması için uygun difüzyon ortamının sağlayarak önemli bir avantaj oluşturmaktadır [124]. Çok sık kullanılan bir yöntem olmasına rağmen elde edilen liflerdeki veya işlem sonrası kimyasal kalıntılar üzerindeki olası toksisite, düşük mekanik özellikler, yavaş üretim oranı vb. gibi bazı kısıtlamaları bulunmaktadır [37].

2.4.2 Faz Ayırımı

Faz ayırımı yöntemi gözenekli doku iskeleleri üretimi için uzun yıllardır kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Bu yöntemde; polimer, bir çözücü içerisinde çözülür ve sonra faz ayrımı, ısıl olarak indüklenir veya polimer içerisinde çözünmeyen bir çözelti kullanılarak jel oluşumu sağlanır. Oluşan jelden çözücüyü çıkarmak için su kullanılır. Daha sonra jel, polimerin cam geçiş sıcaklığının altındaki bir sıcaklığa soğutulur ve nanolif yapılı doku iskelesi elde edilir. Üretilen doku iskelesinin gözenek boyutu ve ağ yapısı faz ayrımında ilave edilen porojenlerin konsantrasyonları, geometrisi ve boyutu değiştirilerek ayarlanabilir. Bu yöntemin en önemli avantajı diğer yöntemlerde gerekli olan özel ekipmanın burda gerekli olmamasıdır [125]. Şekil 2.9'da faz ayırımı metodu şematik olarak gösterilmiştir [37].

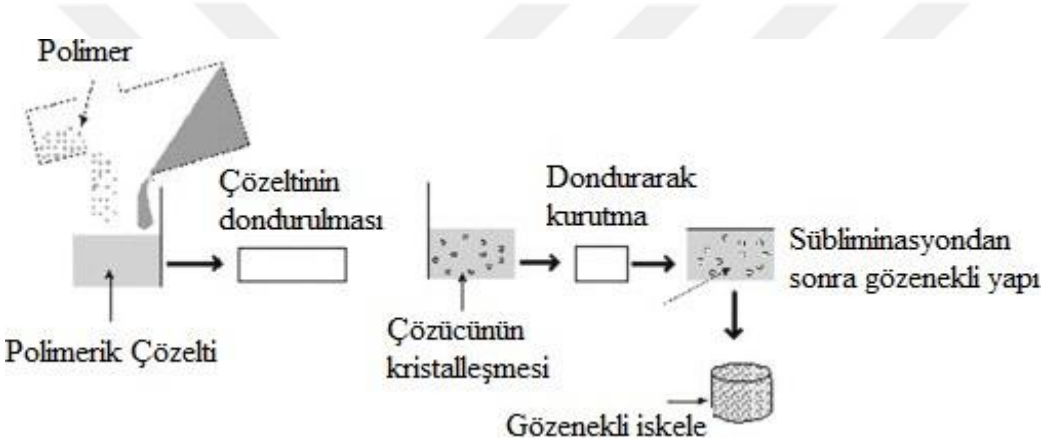


Şekil 2.9: Faz ayırımı metodunun şematik olarak gösterimi [37].

2.4.3 Dondurarak kurutma

Liyofilizasyon yani **dondurarak kurutma işleminde** polimer uygun bir çözücüye koyularak çözelti oluşturulur. Elde edilen çözelti daha sonra donma noktasının altındaki sıcaklığa kadar soğutularak dondurulur. Donma noktasına kadar soğutulan çözeltinin içerisinde oluşan buz kristalleri basıncın düşürülmesiyle süblimleşir ve geriye polimerik yapıda gözenekli bir yapı kalır [37]. İskelenin gözenek yapısı, soğutma işlemi sırasında buz kristallerinin oluşumu kontrol edilerek tasarlanabilir ve uyarlanabilir. Buz kristallerinin boyutu, dağılımı, şekli ve yoğunluğu, donma

parametreleri değiştirilerek kontrol edilebilir. Böylece iskeledeki gözenek boyutu, eğim, şekil ve gözeneklilik özel olarak tasarlanabilir [126]. Dondurarak kurutma yönteminin en önemli avantajı yüksek sıcaklıklara veya ayrı filtrasyon aşamalarına ihtiyaç duyulmamasıdır. Bunun yanı sıra donma hızı kontrol edilerek iskelenin gözenek boyutları ayarlanabilir; daha küçük gözenek boyutu isteniliyorsa daha hızlı donma oranı kullanılır [127]. Fakat bu yöntem kullanılarak üretilen doku iskelerinin mekanik özelliklerinin yeteri kadar iyi olmaması ve hiyerarşik bir yapıya sahip, örneğin vasküler sistemler, iskelelerin üretiminde sınırlı olması dondurak kurutma yönteminin kullanımını kısıtlar [37, 78]. Şekil 2.10'da polimerik gözenekli doku iskelesinin dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak üretilmesinin aşamaları gösterilmiştir [128].



Şekil 2.10: Polimerik gözenekli doku iskelesinin dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak üretilmesinin aşamaları [128].

2.5 Biyoaktivite ve Biyobozunurluk

Yapay vücut sıvısı(SBF), insan kan plazmasındaki iyon konsantrasyonuna sahip sentetik bir sıvıdır. Üretilen biyomalzemelerin biyoaktivitelerinin in vitro değerlendirilmesi ve sıvıda apatit oluşturma yeteneklerinin incelenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır [129].

Literatüre bakıldığında çok sayıda yapay vücut sıvısı geliştirilen çalışmalar yapılmıştır. SBF'nin ilk kullanımı Ringer, Earle (EBSS, Earle's balanced salt solution) ve Hanks (HBSS) tarafından insan kan plazmasının başarılı bir şekilde taklit edilmesiyle tuz dengeli çözelti olarak hazırlanmıştır [50]. Daha sonraki yıllarda

Kokubo ve diğerlerinin yaptığı çalışmalar eklenmiştir. Çizelge 2.9'da çeşitli SBF'lerin ve insan kan plazmasının iyon konsantrasyonları görülmektedir [130].

Çizelge 2.9: SBF'lerin ve insan kan plazmasının iyon konsantrasyonları [130].

	İyon Konsantrasyonu(mM)							
	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	CI^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
İnsan Kan Plazması	142	5	1,5	2,5	103	27	1	0,5
Orijinal SBF	142	5	1,5	2,5	148,8	4,2	1	0
c-SBF (Corrected SBF)	142	5	1,5	2,5	147,8	4,2	1	0,5
r-SBF (Revised SBF)	142	5	1,5	2,5	103	27	1	0,5
n-SBF (Newly improved SBF)	142	5	1,5	2,5	103	4,2	1	0,5

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Yapılan tez çalışmasında ilk olarak BCP tozlarının sol-gel yöntemiyle sentezlenerek kalsinasyonu ve sinterleme prosesleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tozların karakterizasyonu gerçekliştirilerek yüksek saflıkta olmasına özen gösterilmiştir. BCP tozlarına yine sol-gel yöntemiyle belirlenen oranlarda metal iyonları katkılandırılarak metal katkılı BCP tozları elde edilmiştir. Bir sonraki aşamada ise, üretilen tozların belirli miktarlardaki kitosana eklenerek kompozit yapıdaki metal katkılı BCP/kitosan doku iskeleleri hazırlanmıştır.Son olarak, metal katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin karakterizasyonları yapılmış ve in vitro biyoaktivite özelliklerini incelemek için, üretilen iskelelerin SBF içerisine konularak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarla birlikte üretimi ve karakterizasyon aşamaları tamamlanan doku iskelelerinin kemik doku oluşturma potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde yukarıda bahsedilen bütün aşamalarda gerçekleştirilen deneyler hakkında detaylı bilgiler sunulmuştur.

3.1 Kullanılan Malzemeler

Bifazik Kalsiyum Fosfat (BCP) tozlarının üretimi için başlangıç malzemeleri olarak kalsiyum nitrat tetrahidrat ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$; Ca-nitrat), diamonyum hidrojen fosfat ($(NH_4)_2HPO_4$) Merck^{TM} (Almanya) firmasından, lantanyum nitrat hekzahidrat ($La(NO_3)_3.6H_2O$), samaryum nitrat hekzahidrat ($Sm(NO_3)_3.6H_2O$) ve amonyum hidroksit (NH_4OH) Sigma-Aldrich^{TM} (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kitosan doku iskelesi üretiminde kullanılan % ≥75 deasetilasyon derecesine sahip kitosan Sigma-Aldrich^{TM} (Almanya) firmasından satin alınmıştır.

Üretilen metal katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin biyoaktivitelerinin değerlendirilmesi için hazırlanan SBF için sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$), magnezyum klorür hekzahidrat ($MgCl_2.6H_2O$) ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4.H_2O$) Merck^{TM} (Almanya) firmasından ve sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) Sigma-Aldrich^{TM} (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kompozit doku iskelelerinin su içeriğinin belirlenmesinde kullanılan fosfat tampon çözeltisi (PBS) ise, Gündüz^{TM} Kimya (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Doku iskelelerinin üretimi için hazırlanan

kompozitlerin viskozitesini arttırmak amacıyla teknik kalite karboksimetil selüloz (CMC) kullanılmıştır.

3.2 Katkısız ve Katkılı BCP Toz Sentezi

İlk olarak katkısız BCP tozlarının sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir. Ca kaynağı olarak kalsiyum nitrat tetrahidrat ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$) ve P kaynağı olarak diamonyum hidrojen fosfat ($(NH_4)_2HPO_4$) kullanılmıştır. Ca/P stokiyometrik oranı 1,67 olmasına dikkat edilmiştir. 0,5 M $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ ve 0,3 M $(NH_4)_2HPO_4$ iki ayrı çözelti saf su eklenerek elde edilmiştir. $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ çözeltisi manyetik karıştırıcıda (MS300HS) oda sıcaklığında 30 dakika boyunca manyetik balıkla karıştırılmıştır. Daha sonra $(NH_4)_2HPO_4$ çözeltisi damla damla $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ çözeltisine eklenmiştir ve nihai çözelti 2 saat karıştırılmıştır. Çözeltinin pH değerini 10'da tutmak için NH_4OH çözeltiye eklenerek 30 dakika sürekli karıştırılmıştır. Yaşlandırma işlemi gerçekleştirilen çözelti, vakum pompası (DrVAC-300), Seramik Buhner hunisi (90 mm), nuçe erleni ve adaptöründen oluşan vakum filtre düzeneği kullanılarak filtrasyona tabii tutulmuştur. Çözelti süzülerek NH_4^+ ve NO_3^- iyonlarını uzaklaştırmak için saf su kullanılarak tekrar tekrar yıkanmıştır. Şekil 3.1'de kurulan sistemin bileşenleri gösterilmiştir.



(a) (b)

Şekil 3.1: Kurulan sistem bileşenleri: (a) elde edilen çözelti, (b) vakum filtre sistemi.

Ortaya çıkan çökelti etüvde 100 °C'de 48 saat bekletilmiş ve jel kurutulmuştur. Daha sonra, agat havanda öğütülerek ısıl işlem deneyine hazır hale getirilmiştir. Kül fırını kullanılarak hava ortamında (Nevo 110/3) 1200 ° C'de 3 saat tutularak sinterlenmiştir. Şekil 3.2'de vakum filtrasyonundan sonra elde edilen katkısız BCP gösterilmiştir.



Şekil 3.2: Vakum filtrasyonundan sonra elde edilen katkısız BCP.

La katkılı BCP ve Sm katkılı BCP tozlarını sentezlemek için kullanılan prosedür, yukarıda açıklanan prosedüre benzerdir. La kaynağı olarak lantanyum nitrat hekzahidrat ($La(NO_3)_3.6H_2O$) ve Sm kaynağı samaryum nitrat hekzahidrat $Sm(NO_3)_3.6H_2O$) kullanılmıştır. 0,3 M $(NH_4)_2HPO_4$ çözeltisi, $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ ve $La(NO_3)_3.6H_2O$ (Ca + La = 0.5 M; Ca/La molar oranı = 11/1, 9/1, 7/1, 5/1) çözeltisine damla damla ilave edilmiştir ve çözelti oda sıcaklığında 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. NH_4OH eklenerek çözeltinin pH değeri 11'de tutulmuştur. Çözelti 4 saat boyunca sürekli olarak karıştırılmıştır ve daha sonra çözeltiler filtrelendikten sonra ve 48 saat boyunca 100 ° C'de kurutulmuştur. Kurutulan jel kül fırını kullanılarak hava ortamında 1200 ° C'de 3 saat tutularak sinterlenmiştir.

$Sm(NO_3)_3.6H_2O$) ve $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, Sm/Ca molar oranı, x_{Sm} = 0.02, 0.05 ve 0.1 ve [Ca + Sm]/P stokiyometrik oranı 1.67 olacak şekilde hesaplanarak, saf su içerisinde çözülmüştür. Aynı şekilde 0.3 M $(NH_4)_2HPO_4$ da saf su içerisinde çözülmüştür. Ca + Sm çözeltisi 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. $(NH_4)_2HPO_4$ çözeltisi, Ca + Sm çözeltisine damla damla ilave edilmiştir ve 2 saat boyunca sürekli karıştırılmıştır. Çözelti pH değeri 10 olana kadar NH_4OH eklenmiştir ve istenilen pH değeri elde edildikten sonra 30 dakika daha karıştırılmıştır. Çizelge 3.1'de üretilen

katkısız ve katkılı BCP tozlarına verilen kodlar, Çizelge 3.2'de ise toz sentezi için kullanılan başlangıç malzemelerin miktarları gösterilmiştir. Oluşturulan çözeltiler 10ml'lik çözeltiler halinde hazırlanmıştır.

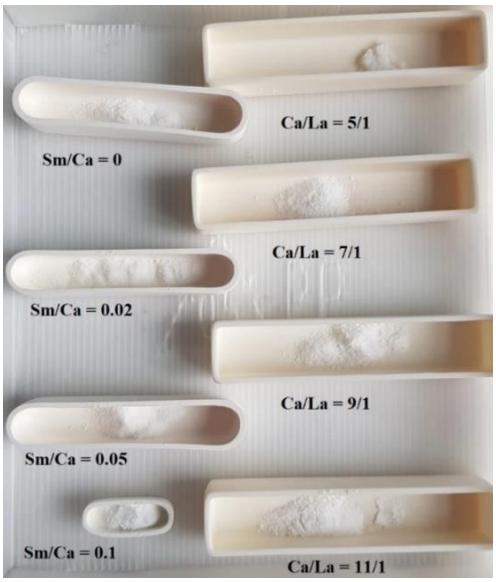
Çizelge 3.1: Sentezlenen katkısız ve katkılı BCP tozlarına verilen kodlar.

Tozlar	**Kodlar**
Katkısız BCP tozları	B
La katkılı BCP (Ca/La oranı = 11/1)	L1B
La katkılı BCP (Ca/La oranı = 9/1)	L2B
La katkılı BCP (Ca/La oranı = 7/1)	L3B
La katkılı BCP (Ca/La oranı = 5/1)	L4B
Sm katkılı BCP (Sm/Ca oranı = 0.02)	S1B
Sm katkılı BCP (Sm/Ca oranı = 0.05)	S2B
Sm katkılı BCP (Sm/Ca oranı = 0.1)	S3B

Çizelge 3.2: Toz sentezi için kullanılan başlangıç malzemelerin miktarları.

Kodlar	**$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (g)**	**$(NH_4)_2HPO_4$ (g)**	**$La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (g)**	**$Sm(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (g)**
B	1,18	0,39	–	–
L1B	1,08	0,54	0,18	–
L2B	1,06	0,53	0,21	–
L3B	1,03	0,52	0,27	–
L4B	0,98	0,24	0,36	–
S1B	1,15	0,58	–	0,04
S2B	1,12	0,56	–	0,11
S3B	1,06	0,53	–	0,22

Reaksiyon gerçekleştikten sonra, çözeltide oluşan jelimsi yapı saf su ile birkaç kez yıkanarak filtreleme işlemi gerçekleştirilmiştir, 100 °C'de 48 saat boyunca etüvde kurutulmuştur. Kurutulan jel laboratuvar fırınında hava atmosferinde 1200 °C'de 3 saat boyunca ısıl işleme tabi tutulmuştur. Isıl işlem sonucunda elde edilen La/BCP ve Sm/BCP tozlarının görüntüleri Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3: Isıl işlem sonucunda elde edilen La katkılı BCP ve Sm katkılı BCP tozlarının görüntüleri**.**

3.3. Katkısız ve Katkılı BCP/Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi

Tez çalışması kapsamında sentezlenen tozlar kitosana katılarak sekiz farklı doku iskelesi dondurarak kurutma yöntemi ile üretilmiştir. Bunlar sırasıyla ağırlıkça %75 katkısız BCP toz ilaveli kitosan ve La ve Sm katkılı ağırlıkça %75 BCP toz katkılı kitosan olup, aşağıda üretimleri hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir.

Öncelikle %2'lik (ağırlık/hacim) kitosan çözeltisi hazırlamak için, 0.2 M asetik asit, saf su ile manyetik karıştırıcıda yaklaşık bir gün boyunca karıştırılarak hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti, farklı miktarlardaki katkısız, La ve Sm katkılı BCP tozları ile sekiz farklı kompozit çözelti elde edilmiştir. Çizelge 3.3'te hazırlanan kompozitler ve kompozitlere verilen kodlar verilmiştir.

Çizelge 3.3: Hazırlanan kompozitler ve kodları.

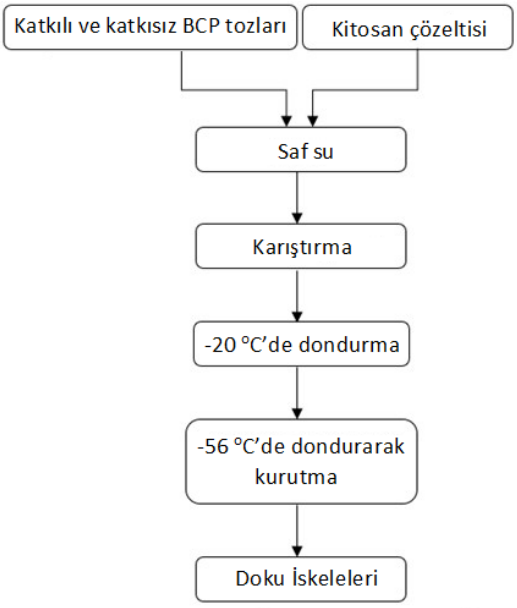
Kompozitler	**Kodlar**
%ağ. 75 BCP - %ağ. 25 kitosan	K3-B
La katkılı %ağ. 75 BCP - %25 kitosan (Ca/La oranı = 11/1)	K3-L1B
La katkılı %ağ. 75 BCP - %25 kitosan (Ca/La oranı = 9/1)	K3-L2B
La katkılı %ağ. 75 BCP - %25 kitosan (Ca/La oranı = 7/1)	K3-L3B
La katkılı %ağ. 75 BCP - %25 kitosan (Ca/La oranı = 5/1)	K3-L4B

Çizelge 3.3 (devam): Hazırlanan kompozitler ve kodları.

Kompozitler	Kodlar
Sm katkılı %ağ. 75 BCP - %25 kitosan (Sm/Ca oranı = 0,02)	K3-S1B
Sm katkılı %ağ. 75 BCP - %25 kitosan (Sm/Ca oranı = 0,05)	K3-S2B
Sm katkılı %ağ. 75 BCP - %25 kitosan (Sm/Ca oranı = 0,1)	K3-S3B

Kompozit çözeltilerin her biri için kitosan miktarı sabit tutulmuştur. Katkısız ve katkılı BCP tozları saf suda çözdürülmüş ve yavaşça kitosan çözeltisine eklenerek hazırlanmıştır. Kompozit çözeltilerin her biri, kitosan miktarı sabit tutularak ve katkılar ayrı ayrı suda çözülüp yavaşça kitosan çözeltisine eklenerek 10'ar ml olarak hazırlanmıştır. Her bir kompozit çözeltisine bir miktar CMC viskozite artırıcı ajan olarak eklenmiştir. Böylece kitosan kompozitler dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskelesi üretimine hazır hale getirilmiştir.

Üretilen kompozitler, -20 °C'de dondurulmuş ve -56 °C'de bir liyofilizatör kullanılarak "dondurarak kurutma" işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlem için Bursa Teknik Üniversitesi (BTÜ) Gıda Mühendisliği Laboratuvarlarında Toros marka TRS 2/2V model liyofilizatör cihazı kullanılmıştr. Aşağıda dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak üretilen doku iskeleleri için akış şeması Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4: Doku iskelelerinin üretimi.

3.4 Karakterizasyon Çalışmaları

Sentezlenen katkısız BCP, La katkılı BCP, Sm katkılı BCP tozlarının ve üretilen doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları kapsamında partikül boyut analizleri, faz analizleri, mikroyapı analizleri, yoğunluk ve gözeneklilik ölçümleri ve mekanik dayanım analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 Partikül boyut analizleri

Tez çalışmasında elde edilen ve doku iskeleleri üretiminde başlangıç malzemeleri olan katkısız BCP, La katkılı BCP ve Sm katkılı BCP tozlarının partikül boyut analizleri Malvern^{TM} Mastersizer 3000 cihazıyla yapılmıştır ve dağıtıcı ortam olarak saf su kullanılmıştır. 3'er kez yapılan analizler sonucunda hesaplanan oranlar ± standart sapma değerleriyle verilmiştir.

3.4.2 Faz analizleri

Üretilen tüm tozların ve doku iskelelerinin faz analizleri X-Işını kırınım yöntemi (XRD) ve Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi cihazı (FT-IR) (kullanılarak kaydedilmiştir. BrukerTM Discovery D8 Advantage X-ışınları difraktometre cihazıyla gerçekleştirilen faz analizlerinde, monokromatik CuKα radyasyonu (λ = 1.5418 ˚ A) kullanılmıştır. Ölçüm aralığı 5 ˚ artırılarak 20 ˚ ve 80 ˚ (2θ) aralığı belirlenmiştir ve her aralıktaki ölçüm süresi ise 34 saniye olarak belirlenerek faz analizleri kaydedilmiştir. FTIR analizleri ise Nicolet™ iS50 cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

3.4.3 Mikroyapı analizleri

Taramalı electron mikroskobu (SEM) ile sentezlenen tüm tozların ve doku iskelelerin mikroyapıları farklı büyüklüklerdeki görüntüleri alınarak belirlenmiştir. Numune görüntüleri Carl Zeiss^{TM} Gemini 300 SEM cihazı kullanılarak incelenmiştir. Mikroyapı görüntülerinin yanı sıra numunelerin elemental kompozisyonları SEM cihazına bağlı olan Bruker^{TM} EDS dedektörüyle analiz edilmiştir. Numuneler SEM görüntüleme öncesi altın-paladyum tabakası ile kaplanarak iletkenlik kazanması sağlanmıştır.

3.4.4 Şişme çalışmaları

Üretilen BCP ve doku iskelelerinin su alım kapasitesini belirlemek amacıyla 37 ° C'de bir termal çalkalayıcıda fosfat tamponlu tuzlu su (PBS; pH 7,4) çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Deney öncesi iskelelerin kuru ağırlığı (W_D) hassas terazi yardımıyla tartılmıştır. Daha sonra kuru ağırlığı tartılan doku iskeleleri çözelti içerisinde şişmeye bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarında bekletilen doku iskeleleri çözelti içerisinden alınmıştır. Yüzeyindeki sıvısı uzaklaştırılan doku iskelelerinin ıslak ağırlıkları (Ww) ölçülmüştür. Şişme oranı, Denklem 3.1 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Şişme Oranı} = \frac{W_w - W_D}{W_D} \times 100 \quad (3.1)$$

W_D: Doku iskelelerinin kuru ağırlığı

W_w: Doku iskelelerinin ıslak ağırlığı

3.4.5 Yoğunluk ve gözeneklilik ölçümleri

Üretilen doku iskelelerinin yoğunluk ölçümü, Archimedes yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak doku iskelelerinin kuru ağırlığı (W_1) hesaplanarak kaydedilir. Daha sonra numuneye ince bir ip bağlanarak teraziye asılır ve su içerisinde tartılır. Elde edilen bu değer W_2 olarak kaydedilir. Son olarak numuneler su içerisinden çıkarılarak sadece yüzeylerindeki ıslaklık giderilecek şekilde silinerek tartılır. Bu değer ise W_3 olarak kaydedilir. Ölçümlerden elde edilen sonuçlarla birlikte denklem 3.2 kullanılarak gözenek miktarı, denklem 3.3 kullanılarak bulk yoğunlukları hesaplanmıştır [131].

$$\text{\% Gözenek Miktarı} = \frac{W_3 - W_1}{W_3 - W_2} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{Bulk yoğunluk} = \frac{W_1}{W_3 - W_2} \times d_s \quad (3.3)$$

W_1: Doku iskelesinin kuru ağırlığı

W_2: Doku iskelesinin su içerisindeki ağırlığı

W_3: Doku iskelesinin sudan çıkarıldıktan sonraki ağırlığı

d_s: Su yoğunluğu

3.4.6 Mekanik dayanım analizi

Sentezlenen BCP, La/BCP ve Sm/BCP katkılı bütün doku iskelelerinin mekanik özellikleri hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla basma mukavemeti ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler, mekanik test cihazında (ShimadzuTM AGS-X; Japonya), 10

mm çapa ve 1 mm yüksekliğe sahip doku iskelelerinin üzerine 500 N'luk bir yüke sahip ve 1 mm/dk'lık sabit hızla kuvvet uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Testler sonucunda gerilim-gerinim eğrileri elde edilmiştir.

3.5. Yapay Vücut Sıvısı (SBF) Hazırlanması ve Biyoaktivite Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında sentezlenen BCP tozları ve doku iskelelerinin in vitro biyoaktivite çalışmaları kapsamında SBF hazırlanarak içerisinde gerçekleştirilmiştir. İyon derişimini arttırmak ve apatit oluşumunu kolaylaştırmak amacıyla SBF'nin 5 katı olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır. Başlangıç olarak 750 ml saf suya Çizelge 3.3'de gösterilen kimyasallar sırasıyla eklenmiştir. Son aşama olarak çözeltinin pH'ını 7,4 olacak şekilde ayarlanarak biyoaktivite çalışmalarına hazır hale getirilmiştir. Çizelge 3.4'te toplam hacmi 1000 ml olacak şekilde hazırlanan 10xSBF çözeltisinde yer alan kimyasallar gösterilmektedir [130].

Üretilen doku iskelelerinde apatit oluşmasının gözlenmesi amacıyla, numuneler 37 ºC'de 7 gün boyunca yapay vücut sıvısı içerisinde bekletilerek biyoaktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 7 gün boyunca SBF çözeltisinde bekletilen doku iskeleleri, saf suyla yıkanmış ve ardından dondurarak kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Kurutulan doku iskelelerinin SEM-EDS analizi ile yüzey morfolojileri incelenmiş, kemiği oluşturma fonksiyonunun belirlenmesine yönelik sonuçlar değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.4:10xSBF çözeltisindeki kimyasallar [130].

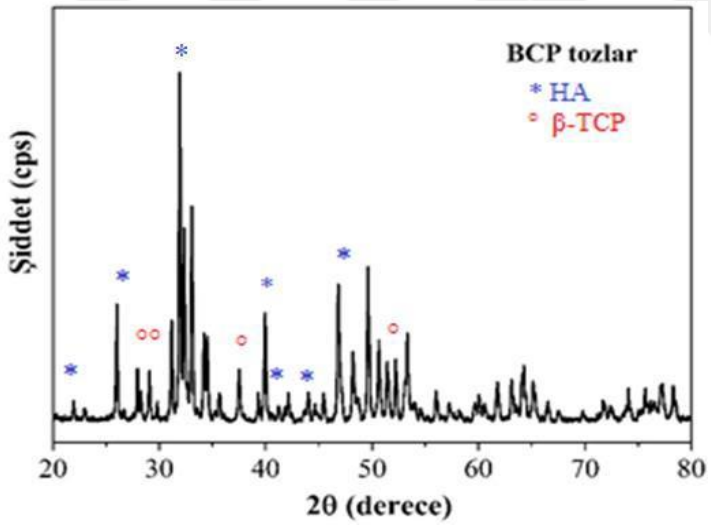
Sıra	Kimyasallar	Miktar	
		SBF	5xSBF
0	Saf Su	750 ml	750 ml
1	NaCl	8,035 g	80,35 g
2	$NaHCO_3$	0,355 g	3,55 g
3	KCl	0,225 g	2,25 g
4	K_2HPO_4-$3H_2O$	0,231 g	2,31 g
5	$MgCl_2$-$6H_2O$	0,311 g	3,111 g
6	$CaCl_2$	0,292 g	2,92 g
7	Na_2SO_4	0,072 g	0,72 g
8	$(CH_2OH)_3CNH_2$	6,118 g	61,18 g
9	1.0M-HCl	pH'ı ayarlamak için uygun miktar	

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmaların sonuçları bu bölümde sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır. İlk olarak, katkısız, La ve Sm katkılı BCP tozlarının sentezlenmesi ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiştir. Ardından, kemik doku uygulamalarında kullanılmak üzere BCP/kitosan, La katkılı BCP/kitosan ve Sm katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin dondurarak kurutma yöntemiyle üretimi ve karakterizasyonu için yapılan çalışmaların sonuçları açıklanmıştır. Son olarak, üretilen doku iskelelerinin SBF çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen biyoaktivite çalışmaları yapılmış ve elde edilen bulgular üzerinde tartışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.1 BCP Tozlarının Sentezi ve Karakterizasyonu

Sol-jel işleminden sonra 1200 °C'de 3 saat boyunca ısıl işleme tabi tutularak elde edilen katkısız BCP tozlarına ait XRD paterni Şekil 4.1'de verilmiştir.

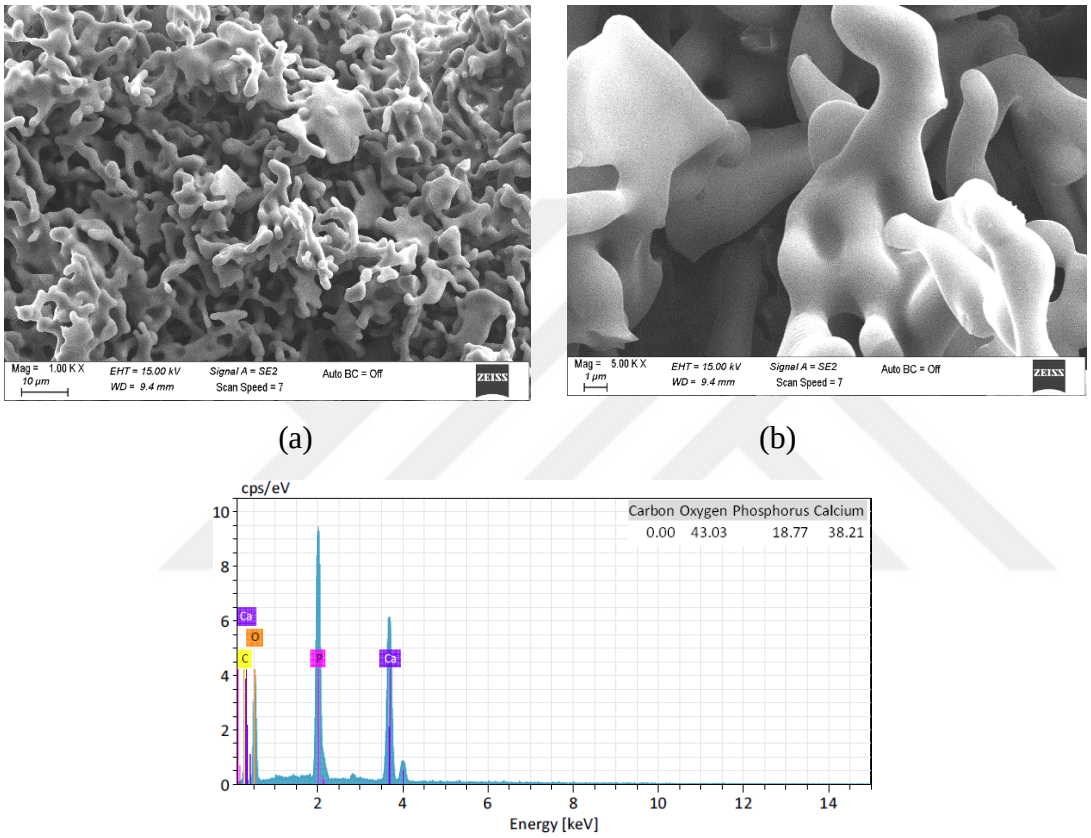


Şekil 4.1: Sol-jel işleminden sonra 1200 °C'de 3 saat boyunca ısıl işleme tabi tutularak elde edilen katkısız BCP tozlarının XRD analiz sonucu.

Katkısız BCP'nin XRD analizinde, ICDD (Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi) standardına uygun olarak HA (JCPDS: 09-0432) ve β-TCP'ye (JCPDS: 09-169) karşılık gelen ana pikler gözlemlenmiştir. Şekil 4.1'de sentezlenen tozun 2θ = 25.9°, 31.8°, 32.2°, 33°, 34.1°, 46.8° ve 49.6° noktalarında HA'nın, 2θ = 25.8°, 26.7°, 29.7°, 31.1 ° ve 34.5° noktalarında β-TCP'nin ana karakteristlik pikleri görülmüştür. XRD

sonucuna göre HA ve β-TCP'den oluşan BCP yapısının (PDF Kart No: 01-073-4869) elde edildiğini ortaya koymuştur [132].

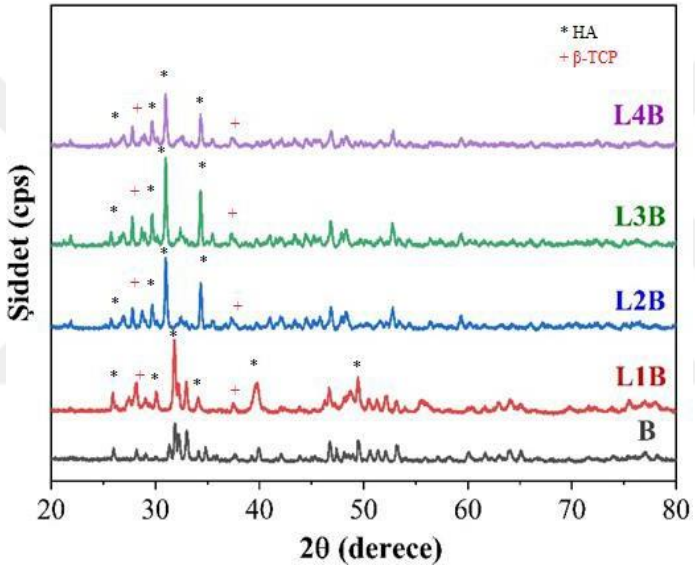
Sol-jel ve ardından 1200 °C'de 3 saat ısıl işlemden sonra sentezlenen katkısız BCP tozlarının 1.00Kx ve 5.00Kx büyütmedeki SEM görüntüleriyle EDS sonuçları Şekil 4.2'de verilmiştir. SEM görüntülerine bakıldığında bu dağılımın ise homojen olmadığı, aglomera olduğu görülmektedir. EDS sonuçlarında BCP tozunda Ca, P ve O atomlarının varlığı kanıtlanmıştır.



Şekil 4.2: Katkısız BCP tozlarının (a) 1.00Kx büyütmedeki SEM görüntüsü, (b) 5.00Kx büyütmedeki SEM görüntüsü, (c) EDS analiz sonucu.

4.2 Katkılı BCP Tozlarının Sentezi ve Karakterizasyonu

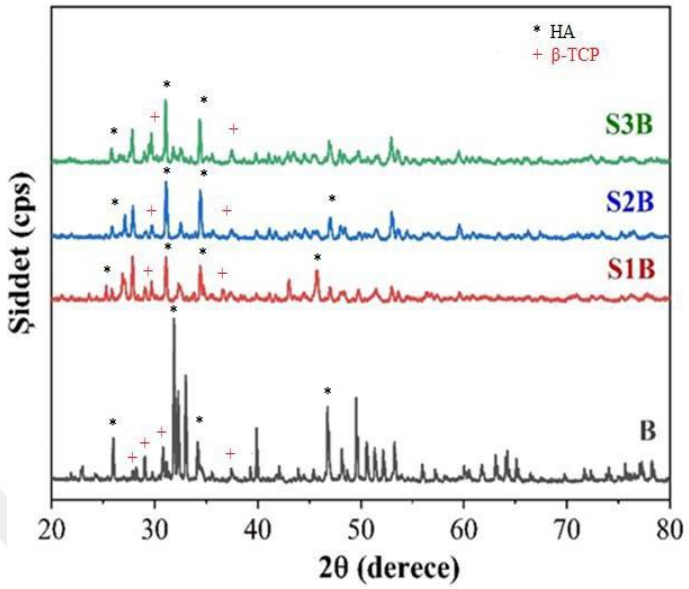
Sol-jel prosesinden sonra 1200 °C'de 3 saat boyunca sinterlenerek sentezlenen La katkılı BCP tozlarına ait XRD paterni Şekil 4.3'te verilmiştir. XRD analiz sonuçlarına bakıldığında, sentezlenen bütün tozların yapısında HA (PDF Kart No: 86-0740) ve β-TCP (JCPDS: 70-2065) fazlarına ait pikler görülerek BCP'nin varlığı doğrulanmıştır. La'nın BCP yapısına takviye edilmesiyle birlikte, La miktarının artması piklerin tepe noktalarında kaymalara sebep olmuştur. Bunun sebebi, La^{3+} iyon yarıçapının Ca^{2+}'ninkinden önemli ölçüde daha küçük olduğu gerçeğiyle tutarlıdır ve La^{3+} iyonun başarılı bir şekilde BCP kafes yapısına dahil olarak Ca^{2+} iyonlarına ikame etmesidir. Bu durum JCPDS kart no (09-703-8855) ile eşleşmektedir.



Şekil 4.3: Sol-jel yöntemi ile sentezlenen La katkılı BCP partiküllerin XRD analiz sonucu.

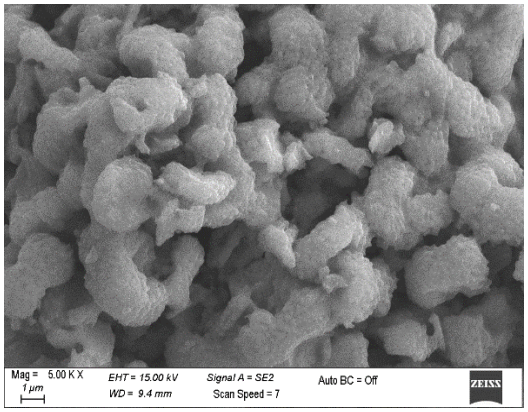
Sol-jel prosesinden sonra 1200 °C'de 3 saat boyunca sinterlenerek sentezlenen Sm katkılı BCP tozlarına ait XRD paterni Şekil 4.4'te verilmiştir. XRD analiz sonuçlarına bakıldığında, sentezlenen tüm tozlarda HA (JCPDS: 72-1243) ve β-TCP (JCPDS 09-0169) varlığı kanıtlanarak BCP toz sentezinin gerçekleştiği görülmüştür. Sm'nin BCP yapısına takviye edilmesiyle birlikte Sm katkılı BCP tozlarının XRD spektrumlarındaki tepe yoğunlukları azalmış ve Sm konsantrasyonu arttıkça tepe noktaları genişlemiştir. Iconaru ve çalışma ekibinin [133] yaptığı çalışmayla iyi bir uyum içinde olduğu, Sm katkılı BCP tozlarında Sm konsantrasyonu arttığında genişleyen pikler, partikül boyutunun azalmasına sebep olmuştur. Ayrıca Ravindran

[134] ve Shirkhanzade [135] tarafından yapılan çalışmalarla uyumlu olarak Sm^{3+} iyonlarının BCP kristal yapısını etkilemeden Ca^{2+} iyonlarını başarılı bir şekilde ikame ettiğini göstermektedir.

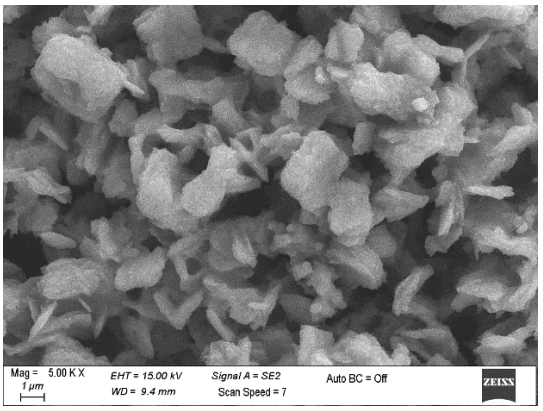


Şekil 4.4: Sol-jel yöntemi ile sentezlenen Sm katkılı BCP partiküllerin XRD analiz sonucu.

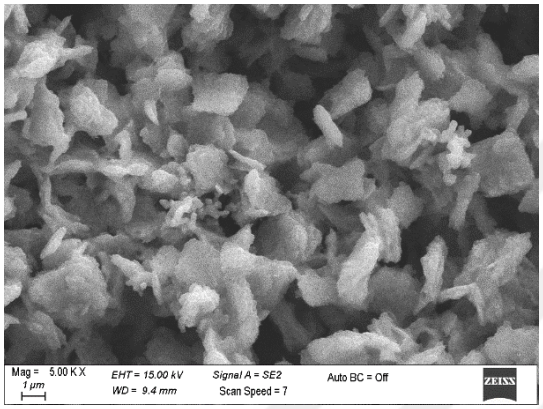
Şekil 4.5'te sol-jel ve ardından 1200 °C'de 3 saat ısıl işlemden sonra sentezlenen L1B, L2B, L3B ve L4B tozlarının 5.00Kx büyütmedeki SEM görüntüleri verilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde La'nın sahip olduğu yüksek atom numarası sebebiyle La'nın oluşturduğu fazlara çarpan elektronun geri saçılması fazla olacağından daha yüksek parlaklık görülmüştür. La katkılı BCP tozlarının aglomera olarak küresel şekilli olduğu görülmüştür. Aglomeraların boyutu, La miktarı arttıkça artma eğilimindedir.



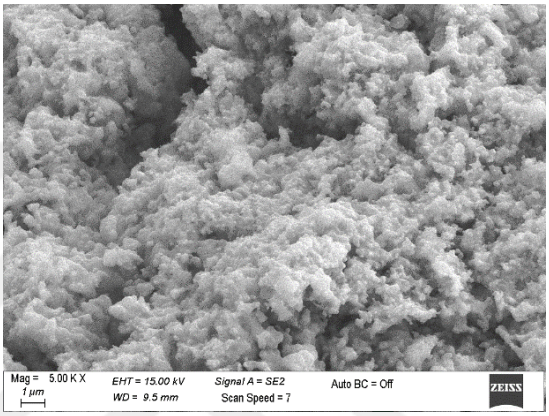
(a)



(b)



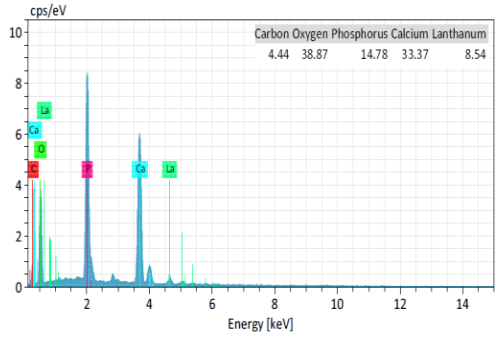
(c)



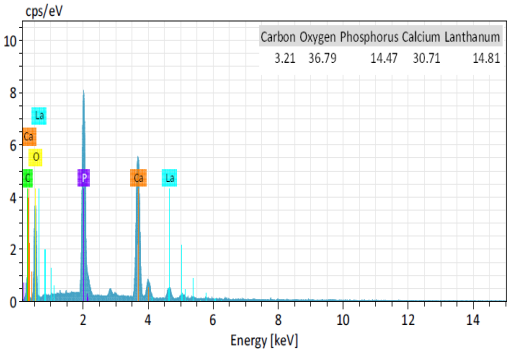
(d)

Şekil 4.5: Sentezlenen tozların 5.00Kx büyütmedeki SEM görüntüleri: (a) L1B, (b) L2B, (c) L3B, (d) L4B.

Şekil 4.6'da L1B, L2B, L3B ve L4B numunelerinin EDS analiz sonuçları verilmiştir. Her dört numunenin EDS sonuçlarında BCP tozunda Ca, P, O ve La atomlarının varlığı kanıtlanmıştır.

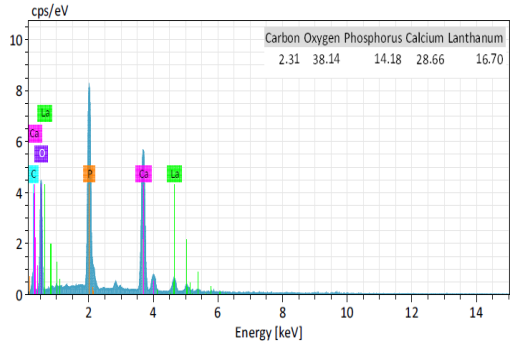


(a)

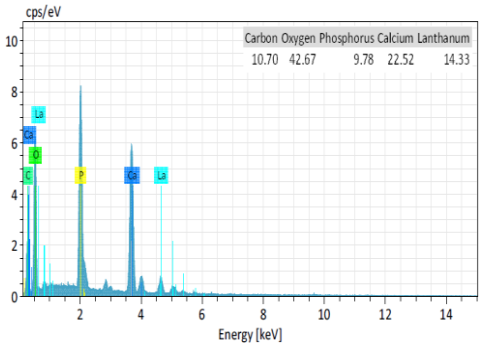


(b)

Şekil 4.6: EDS analiz sonuçları (a) L1B, (b) L2B, (c) L3B, (d) L4B.



(c)



(d)

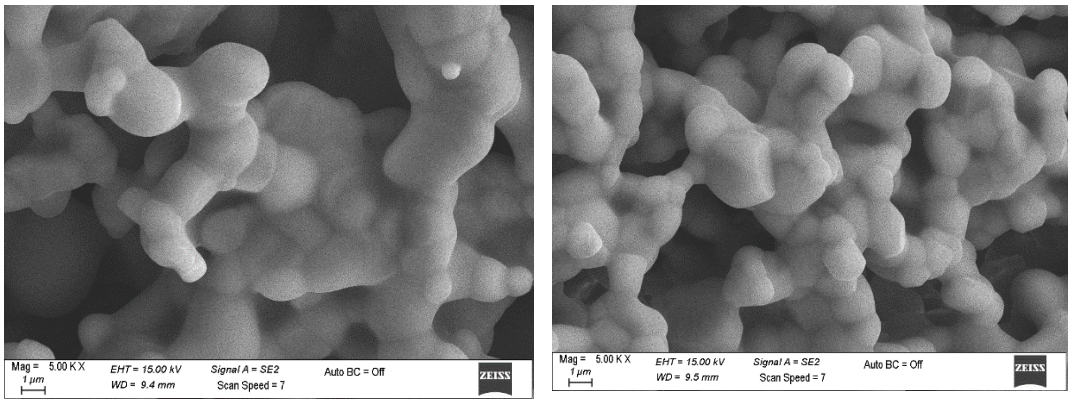
Şekil 4.6 (devam): EDS analiz sonuçları (a) L1B, (b) L2B, (c) L3B, (d) L4B.

Çizelge 4.1'de katkısız BCP ve La katkılı BCP'lerin fiziksel özellikleri gösterilmektedir. La miktarı arttıkça kompozit tozların ortalama partikül boyutu ve yoğunlukları artış göstermiştir.

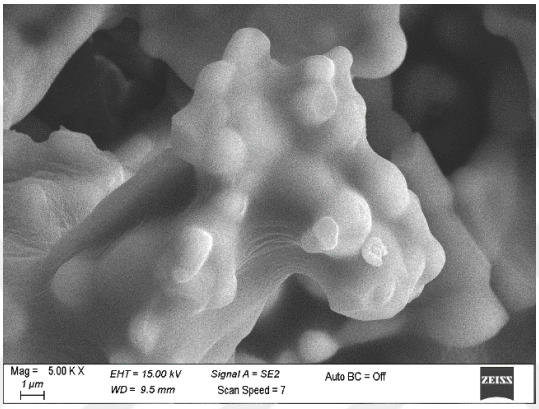
Çizelge 4.1: Sol-jel yöntemi ile sentezlenen La katkılı BCP partiküllerin fiziksel özellikleri.

Numune Kodları	**Ortalama Partikül Boyut (µm)**	**Gerçek Yoğunluk (g/cm^3)**
B	10,25±0,3	2,42
L1B	11,38±0,5	3,00
L2B	17,23±0,2	3,07
L3B	15,71±0,7	3,25
L4B	18,22±0,6	3,64

Şekil 4.7'de sol-jel ve ardından 1200 °C'de 3 saat ısıl işlemden sonra sentezlenen S1B, S2B ve S3B tozlarının 5.00Kx büyütmedeki SEM görüntüleri verilmiştir. Sem görüntüleri incelendiğinde BCP yapısına Sm katkısıyla birlikte S1B, S2B ve S3B numunelerinin genel yüzey morfolojileri çok benzer olduğu görülmüştür. S3B numunesinde tane yapılarının daha küresel olduğu ve aglomerasyonun azaldığı görülmüştür.



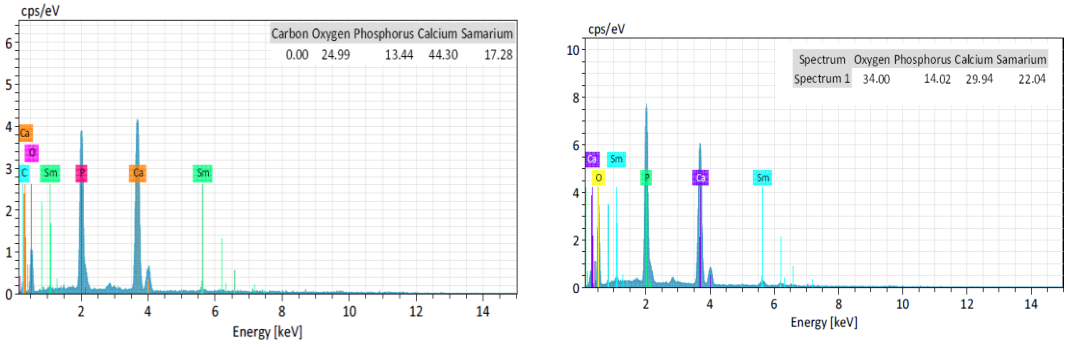
(a) (b)



(c)

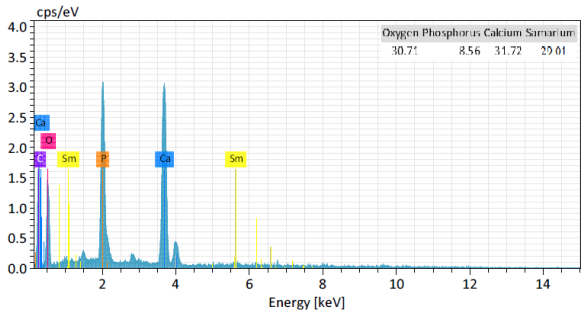
Şekil 4.7: Sentezlenen tozların 5.00Kx büyütmedeki SEM görüntüleri: (a) S1B, (b) S2B, (c) S3B.

Şekil 4.8'de S1B, S2B ve S3B numunelerinin EDS analiz sonuçları verilmiştir. Her üç numunenin EDS sonuçlarında BCP tozunda Ca, P, O ve Sm atomlarının varlığı kanıtlanmıştır.



(a) (b)

Şekil 4.8: EDS analiz sonuçları (a) S1B, (b) S2B, (c) S3B.



(c)

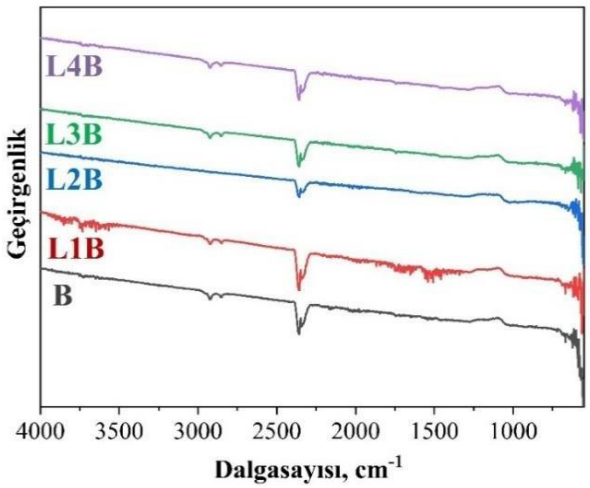
Şekil 4.8 (devam): EDS analiz sonuçları (a) S1B, (b) S2B, (c) S3B.

Çizelge 4.2'de katkısız BCP ve Sm katkılı BCP'lerin fiziksel özellikleri gösterilmektedir. Katkısız BCP'nin mikroyapısı ile karşılaştırıldığında, S1B, S2B ve S3B kompozit tozlarının tümünde, kristallik derecesindeki eğilime benzer şekilde, katkısız BCP'den daha küçük tane boyutları sergilediği [72] ve daha fazla Sm ilavesiyle azaldığı ayrıca yoğunluğunda Sm miktarının artmasıyla birlikte artış görülmüştür.

Çizelge 4.2: Sol-jel yöntemi ile sentezlenen Sm katkılı BCP partiküllerin fiziksel özellikleri.

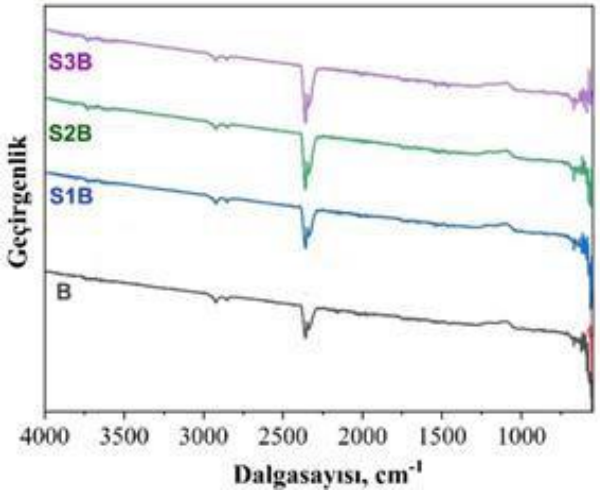
Numune Kodları	**Ortalama Partikül Boyut (µm)**	**Gerçek Yoğunluk (g/cm^3)**
B	10,82±0,6	2,42
S1B	9,94±0,7	2,57
S2B	8,25±0,7	2,8
S3B	8,43±0,8	3,16

Şekil 4.9'da La katkılı BCP tozlarının FTIR analiz sonuçları verilmiştir. Literatür tarandığında 1200-550 cm^{-1} bölgelerindeki pikler, BCP'nin başlıca moleküler bileşenleri olan fosfat iyonlarından (PO_4^{3-}) kaynaklanmaktadır [136]. 2750-3000 cm^{-1} bandındaki pikler absorbe edilen suya ait olan piklerdir [137] ve sadece L2B tozunda gözlemlenmemiştir. Kumar ve arkadaşlarının [138] yaptığı çalışmayla uyumlu olarak, yaklaşık olarak 2340 ve 2360 cm^{-1}'de gözlemlenen pikler, La ait pikler olduğu görülmüştür. Böylece La'nın BCP fazında oluşumunu teyit etmektedir.



Şekil 4.9: La katkılı BCP tozlarının FTIR analiz sonuçları

Şekil 4.10'da üretilen Sm katkılı BCP tozlarının FTIR analiz sonuçları verilmiştir. Buna göre Sm katkılı BCP tozu için 876 cm^{-1}'de HPO_4^{2-} bandı gözlenmektedir. Fakat, Sm katkılı BCP tozlarının FTIR'ında, HPO_4^{2-} bandı görülmemiştir. Bunun sebebiyse, Sm ile katkılandıktan sonra HPO_4^{2-} yoğunlaşması daha hızlı gerçekleşmiş ve Sm katkılı BCP tozlarındaki BCP'nin, bant daraldıkça ve keskinleştikçe daha yüksek kristalliğe sahip olduğunu göstermiştir. 1023 cm^{-1} ve 1090 cm^{-1}'de P–O simetrik ve asimetrik germe titreşimleri gözlenmiştir [139]. 2750-3000 cm^{-1} bandındaki pikler zayıf hidroksilin (OH^-) germe titreşimine ait pikleridir [140].

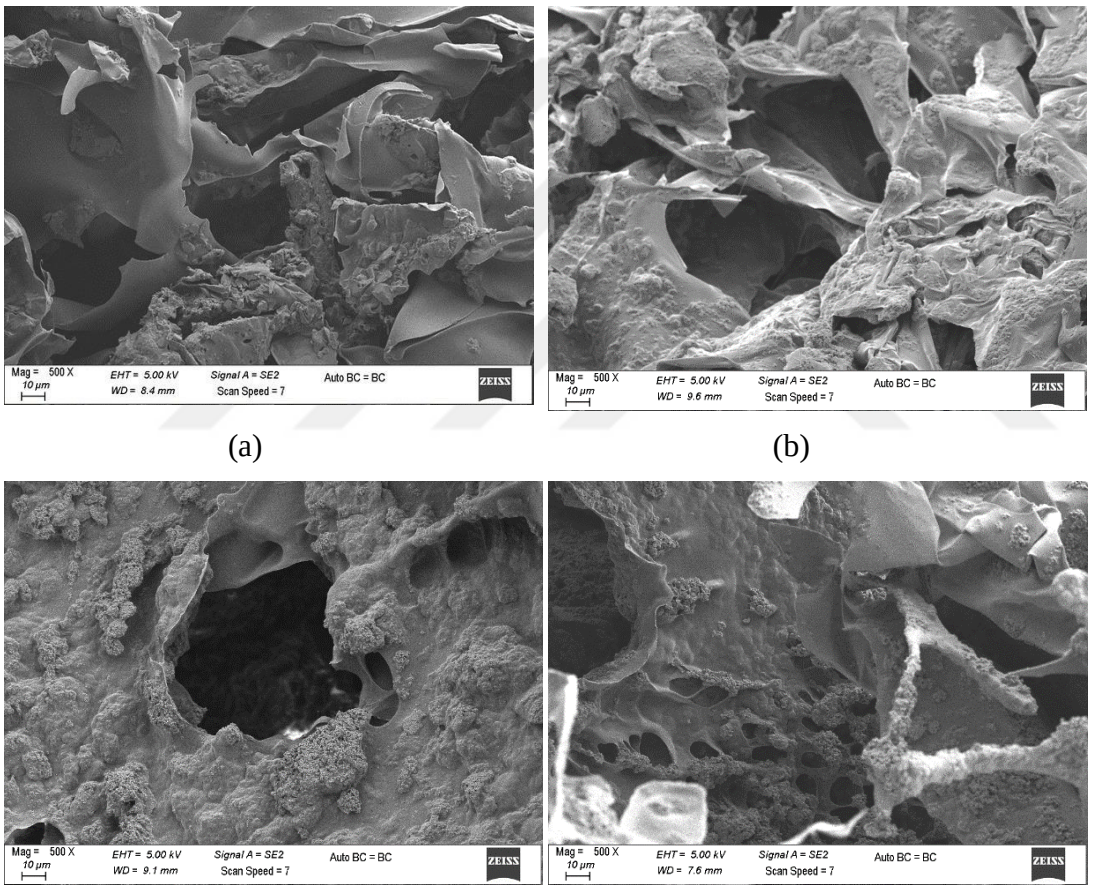


Şekil 4.10: Sm katkılı BCP tozlarının FTIR spektrumu.

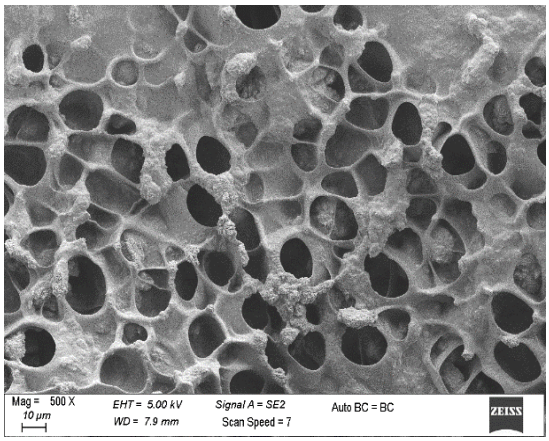
4.3 Kompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

4.3.1 Mikroyapı analizi

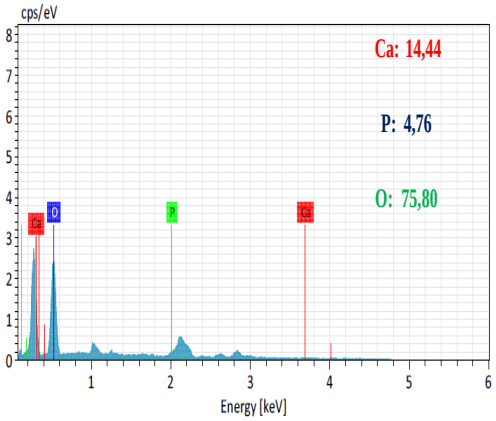
Katkısız BCP ve katkılı BCP tozlarına kitosan eklenip daha sonra dondurarak kurutma yöntemiyle üretilen kompozit doku iskelelerinin gözenekli yapıları SEM görüntüleri ile belirlenmiştir. Şekil 4.11'de üretilen BCP/kitosan ve La katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin 500x büyütmedeki SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntülere bakıldığında bütün doku iskelelerinde gözenek oluştuğunu fakat belirgin gözenek oluşumunun K3-L2B doku iskelesinde başladığı ve katkı oranı arttıkça gözenek çapının küçüldüğü, K3-L4B doku iskelesinin en iyi gözenekliliğe sahip olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 4.11: Kompozit doku iskelelerine ait 500X büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) K3-B, (b) K3-L1B, (c) K3-L2B, (d) K3-L3B, (e) K3-L4B ve (f) K3-L4B'nin EDS görüntüsü.



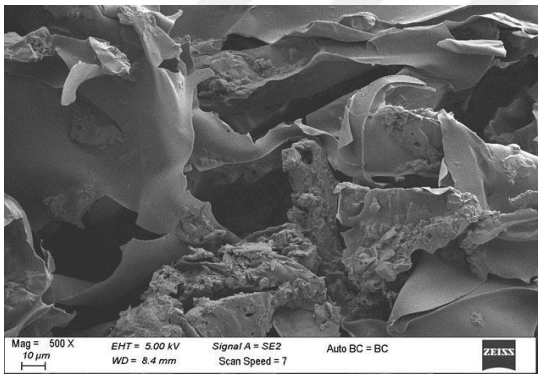
(e)



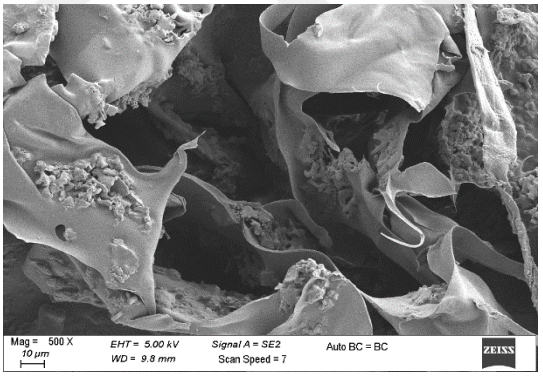
(f)

Şekil 4.11 (devam): Kompozit doku iskelelerine ait 500X büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) K3-B, (b) K3-L1B, (c) K3-L2B, (d) K3-L3B, (e) K3-L4B ve (f) K3-L4B'nin EDS görüntüsü.

Şekil 4.12'de üretilen Sm katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin 500x büyütmedeki SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, bütün doku iskelelerinde gözenek oluştuğunu fakat belirgin gözenek oluşumunun K3-S2B doku iskelesinde başladığı ve katkı oranı arttıkça gözenek çapının küçüldüğü gözlemlenmektedir.

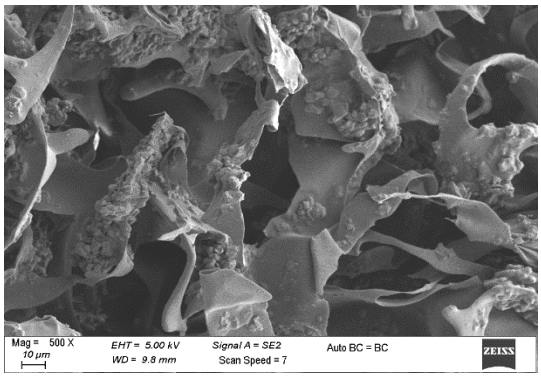


(a)

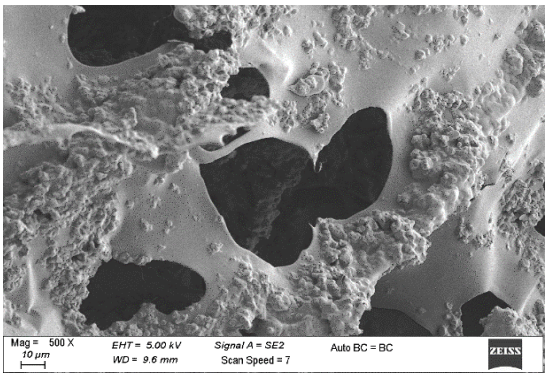


(b)

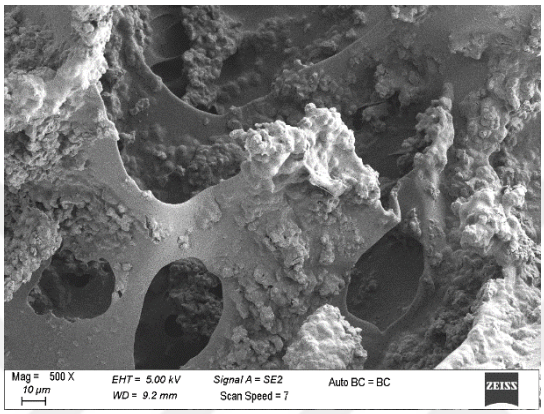
Şekil 4.12: Kompozit doku iskelelerine ait 500X büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) K3-B, (b) K3-B, (c) K3-S1B, (d) K3-S2B ve (e) K3-S3B.



(c)



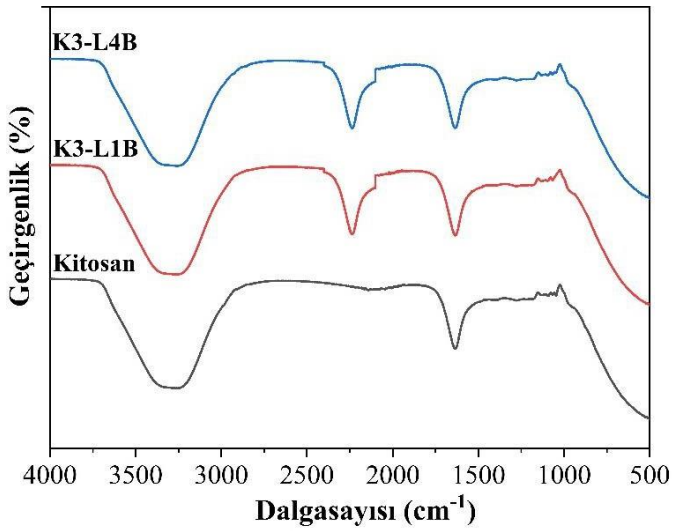
(d)



(e)

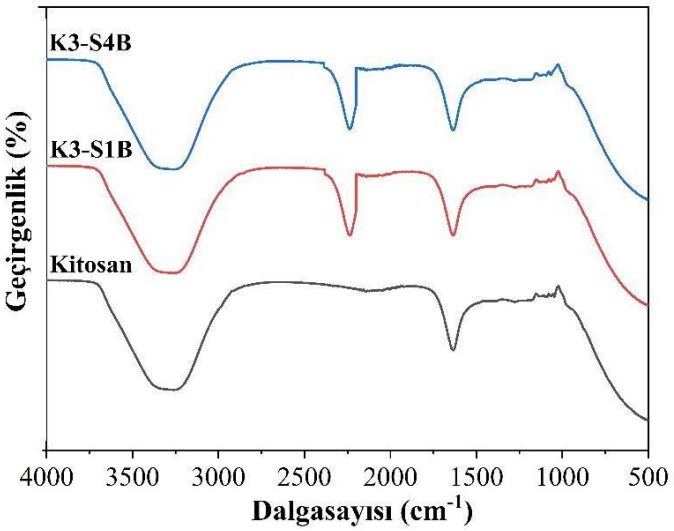
Şekil 4.12 (devam): Kompozit doku iskelelerine ait 500X büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) K3-B, (b) K3-B, (c) K3-S1B, (d) K3-S2B ve (e) K3-S3B.

Şekil 4.13'te üretilen La katkılı BCP ile takviyelendirilmiş doku iskelelerinin FTIR analiz sonuçları verilmiştir. Sonuçlara göre 1654 cm^{-1}'de görülen pik kitosanın yapısındaki N–H gruplarının germe titreşiminden kaynaklanmaktadır. La katkılı BCP /kitosan doku iskeleleri için, 1030 cm^{-1}'deki yoğun absorpsiyon zirvesi, PO_4^{3-} gruplarının germe titreşimine karşılık gelmektedir [141]. Kumar ve arkadaşlarının [138] yaptığı çalışmayla uyumlu olarak, yaklaşık olarak 2340 ve 2360 cm^{-1}'de gözlemlenen pikler, La ait pikler olduğu görülmüştür. 3291 cm^{-1} bölgesindeki bant, molekül içi hidrojen bağlarının yanı sıra N-H ve O-H gerilmesine karşılık gelmektedir [142].



Şekil 4.13: Üretilen La katkılı BCP ile takviyelendirilmiş kompozit doku iskelelerine ait FTIR spektrumu.

Şekil 4.14'te üretilen Sm katkılı BCP ile takviyelendirilmiş doku iskelelerinin FTIR analiz sonuçları verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, 1023 cm^{-1} ve 1090 cm^{-1}'de P–O simetrik ve asimetrik germe titreşimleri gözlenmiştir [139]. Tüm doku iskelelerinin spektrumunda, amid I ve amid II bantları 1655 ve 1599 cm^{-1}'de tespit edilmiştir [143]. 3250 cm^{-1}'deki bant hidroksil grubu ile ilgilidir. Elde edilen FTIR sonuçları, BCP yapısının hem hidroksil hem de fosfat fonksiyonel gruplarının varlığını doğrulamıştır [144, 145]. Sm'nin BCP yapısına ilavesiyle birlikte 2240 cm^{-1} civarında pikler gözlemlenerek, literatürle uyumlu olduğu görülmüştür [146].



Şekil 4.14: Üretilen Sm katkılı BCP ile takviyelendirilmiş kompozit doku iskelelerine ait FTIR spektrumu.

4.3.2 Şişme çalışmaları

Katkısız, La ve Sm katkılı BCP/ kitosan doku iskelelerinin 37 ºC'de PBS (pH=7.4) içerisinde 30, 60 ve 120 dk boyunca gerçekleştirilen şişme deneyleri sonucunda elde edilen şişme değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3: La ve Sm katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin hesaplanan şişme karakteristikleri.

Doku İskeleleri	**Şişme Oranı (ağ./ağ.)**		
	30 dk.	**60 dk.**	**120 dk.**
K3-B	3,89	7,5	6,64
K3-L1B	10,48	17,65	21,01
K3-L2B	8,68	16,54	18,89
K3-L3B	8,14	16,23	14,85
K3-L4B	5,62	14,74	14,97
K3-S1B	8,31	18,64	19,01
K3-S2B	10,27	21,27	23,65
K3-S3B	14,26	22,8	27,19

Doku iskelelerinin şişme davranışları, kemik dokusunun yenilenmesi sırasında besin maddelerinin ve atık ürünlerin difüzyonu ile birlikte vücut sıvısının emilimiyle ilgili olduğu için önem taşımaktadır. Çizelge 4.3 incelendiğinde, katkısız BCP/kitosan doku iskelesinin şişme oranı en düşük olduğu belirlenmiştir. BCP'ye katkılanan La ve Sm, kompozit doku iskelelerinin şişme oranlarını artırdığı gözlemlenmiştir. La katkılı BCP/kitosan doku iskeleleri kendi aralarında karşılaştırıldığında K3-L4B doku iskelesinin en düşük şişme oranı gösterdiği gözlemlenmiştir. La katkısının artması doku iskelesine hidrofobik özelliği göstererek, şişme oranını düşürmüştür.

Sm katkılı BCP/kitosan doku iskeleleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, K3-S1B doku iskelesinin en düşük şişme oranı göstermiştir. Sm katkısının artması doku iskelesine hidrofilik özellik göstererek şişme oranını yükseltmiştir. Katkılı bütün doku iskeleleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise en düşük şişme oranı yine K3-L4B doku iskelesinde görülmüştür. La katkısının artması ve Sm katkısının azalması, doku iskelelerinde homojen bir yapı elde edilmesinin sağladığı düşünülmektedir.

4.3.3 Porozite ve yoğunluk ölçümleri

Üretilen doku iskelelerinin yoğunluk ve gözeneklilik değerleri hesaplanarak Çizelge 4.4'te elde edilen sonuçlara yer verilmiştir. Çizelge 4.4 incelendiğinde, katkısız BCP/kitosan doku iskelesi en düşük yoğunluğa sahip doku iskelesidir. BCP'ye katkılanan La ve Sm, kompozit doku iskelelerinin yoğunluğunu arttırmıştır. La katkılı BCP/kitosan doku iskeleleri kendi aralarında karşılaştırıldığında La katkısı en fazla olan K3-L4B doku iskelesinin yoğunluğu en fazladır. Sm katkılı BCP/kitosan doku iskeleleri kendi aralarında karşılaştırıldığında K3-S2B doku iskelesinin yoğunluğu en fazladır.

Çizelge 4.4: La ve Sm katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin hesaplanan yoğunluk değerleri ve porozite ölçümleri.

Doku İskeleleri	Porozite (%)	Yoğunluk (g/cm^3)
K3-B	11	7,98
K3-L1B	14	8,2
K3-L2B	8	15,15
K3-L3B	9	10,96
K3-L4B	6	16,48
K3-S1B	13	8,90
K3-S2B	12	9,53
K3-S3B	13	9,31

La katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin poroziteleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, La oranının fazla olduğu K3-L4B doku iskelesinin porozitesi en fazladır. Sm katkılı BCP/kitosan doku iskeleleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, porozitenin fazla değişmediği fakat katkısız BCP/kitosana göre bir miktar arttığı görülmüştür.

4.3.4 Mekanik dayanım

Üretilen doku iskelelerinin basma testi ile gerçekleştirilen mekanik dayanım değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Yapılan çalışmada, La ve Sm katkıları doku iskelelerinin basma dayanımlarını arttırdığı görülmüştür. La katkılı BCP/kitosan doku iskeleleri kendi aralarında karşılaştırıldığında La oranının en fazla olduğu K3-L4B doku iskelesinin basma dayanımı en yüksek olanıdır. La oranı arttıkça doku iskelesinin basma dayanımının da arttığı görülmüştür. Sm katkılı BCP/kitosan doku iskeleleri kendi aralarında karşılaştırıldığında Sm oranının en fazla olduğu K3-S3B doku

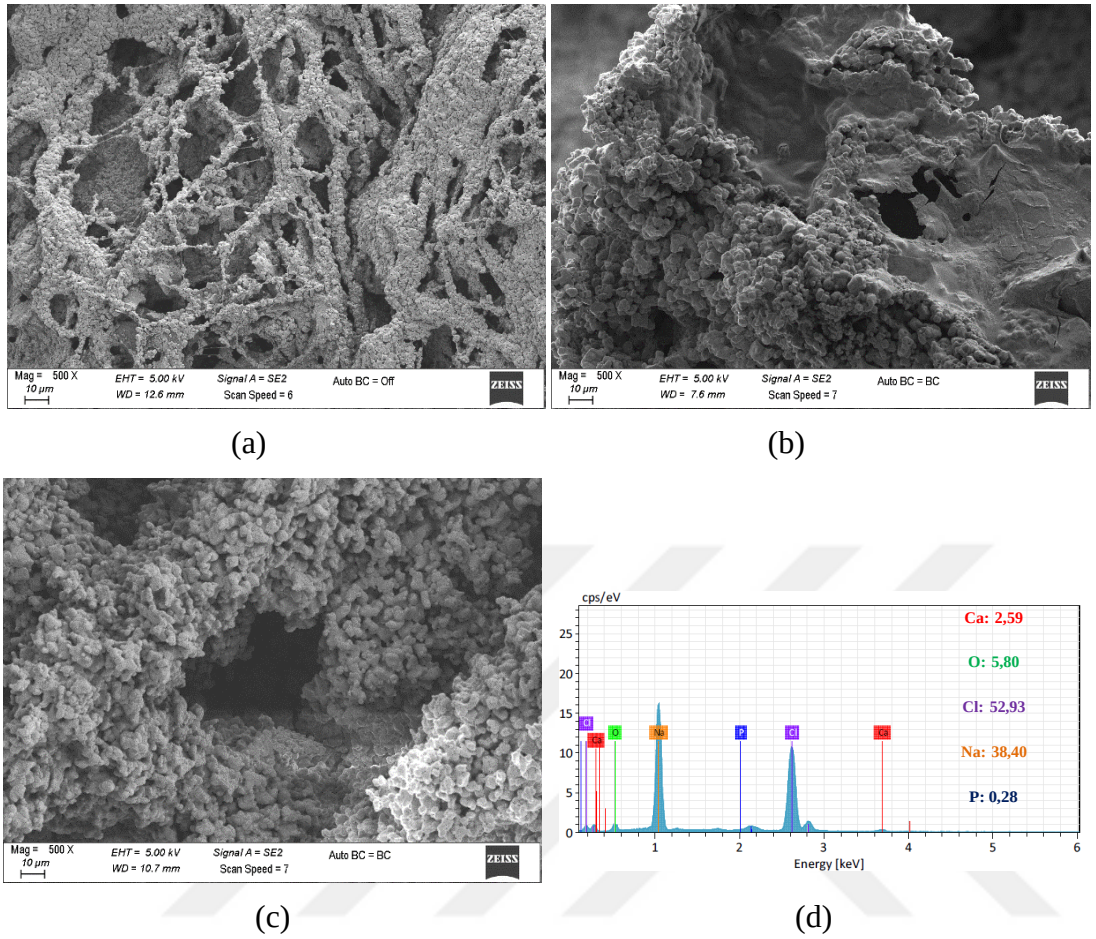
iskelesinin basma dayanımı en yüksek Sm katkılı doku iskelesidir. Sm oranı arttıkça basma dayanımının da arttığı gözlemlenmiştir. Bütün doku iskeleleri karşılaştırıldığında ise K3-L4B doku iskelesinin en iyi basma dayanıma yani mekanik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Sun ve arkadaşlarının [136] yaptığı çalışmada kitosan esaslı doku iskelesine, HA nanoparçacıklarının dahil edilmesiyle basma dayanımı 1.1 MPa'dan 2.8 MPa yükselmiştir. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında, daha yüksek mekanik özellik gösterdiği kanıtlanmıştır. Ancak, doku iskelelerinin sahip olduğu mekanik özellikler kortikal kemiğinkinden düşüktür ve yük taşıma uygulamalarında kullanımını sınırlamaktadır [8].

Çizelge 4.5: La ve Sm katkılı BCP/kitosan doku iskelelerinin mekanik dayanımları.

Doku İskeleleri	Mekanik Dayanım (MPa)
K3-B	4,0234±3,2
K3-L1B	4,1378±2,6
K3-L2B	4,1872±2,1
K3-L3B	4,2341±2,7
K3-L4B	4,2629±2,5
K3-S1B	4,09664±1,6
K3-S2B	4,11643±2,2
K3-S3B	4,16939±2,7

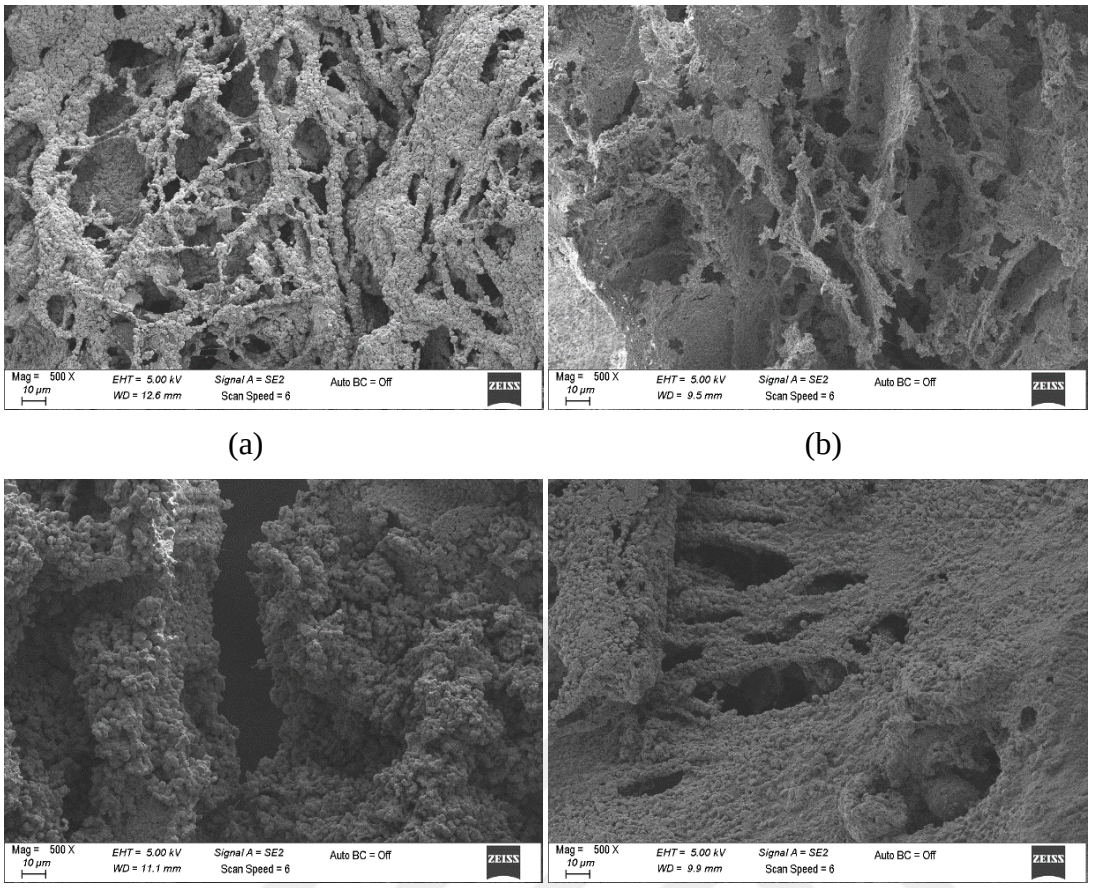
4.4 Doku İskelelerinin Biyoaktivite Çalışmalarının Sonuçları

Üretilen kompozit doku iskelelerinin vücut içerisindeki davranımlarını belirlemek amacıyla SBF içerisinde 7 gün boyunca bekletilmiştir. Daha sonra SEM analizleri uygulanarak numunelerin yüzey karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.15'te üretilen La katkılı kompozit doku iskelelerinin SBF içerisinde 7 gün boyunca bekletildikten sonra kemik benzeri apatit tabakası oluşumunu gösteren 500x büyütmedeki SEM görüntüleri görülmektedir. SEM analizleri sonucunda doku iskelelerinin yüzeyinde HA tabakasının oluştuğu gözlenmiştir. Orijinal doku iskelelerinin yüzeylerine kıyasla, SBF'de bekletilen doku iskelelerinin yüzeyi üzerinde karnabahar benzeri hidroksiapatit tabakası oluşumu açık bir şekilde görülmektedir [147]. EDS analizlerinin sonucunda, doku iskelelerinin yüzeyinde tespit edilen Ca/P oranları hesaplanmış, hesaplanan Ca/P değerleri, SEM fotoğraflarında tespit edilen HA tabakasının varlığını tescil etmiştir.



Şekil 4.15: 7 gün boyunca SBF içerisinde bekletilmiş olan La katkılı kompozit doku iskelelerine ait 500x büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) K3-B, (b) K3-L2B-SBF, (c) K3-L4B-SBF ve (d) K3-L4-SBF'in EDS görüntüsü.

Şekil 4.16'da üretilen Sm katkılı kompozit doku iskelelerinin SBF içerisinde 7 gün boyunca bekletildikten sonra kemik benzeri apatit tabakası oluşumunu gösteren 500x büyütmedeki SEM görüntüleri görülmektedir. Şekil 4.16'daki SEM analizleri incelendiğinde, doku iskelelerinin yüzeyinde Ca/P öbeklerinin oluşmasının yanı sıra, neredeyse tüm yüzeyin apatit tabakasıyla kaplandığı gözlenmiştir. Hesaplanan Ca/P değerleri, SEM fotoğraflarında tespit edilen HA tabakasının varlığını tescil etmiştir. Ayrıca Sm katkısının Ca/P değerini artırdığı görülmüş ancak Sm katkı oranları ile Ca/P değeri arasında net bir ilişki bulunamamıştır. Bununla birlikte en yüksek Ca/P değerine sahip iskelenin K3-S3B doku iskelesi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.16: 7 gün boyunca SBF içerisinde bekletilmiş olan Sm katkılı kompozit doku iskelelerine ait 500X büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) K3-B-SBF, (b) K3-S1B-SBF, (c) K3-S2B-SBF ve (d) K3-S3B-SBF

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yürütülen tez kapsamında, doku mühendisliği uygulamalarındaki doku iskelesi olarak kullanılabilecek çeşitli kompozit yapıların dondurarak kurutma yöntemiyle üretimi ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. İlk aşama olarak sol-jel ve ısıl işlem proseslerini içeren ardışık yöntem ile katkısız, La ve Sm katkılı BCP tozları sentezlenmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki aşamada sentezlenen tozlar kitosana katılarak kompozit yapılar elde edilmiştir. Nihai olarak elde edilen bu kompozit yapıların dondurarak kurutma yöntemiyle doku iskelesi üretimi tamamlanmıştır. En son aşamada ise doku iskelelerinin karakterizasyonları ve biyoaktivite çalışmaları tamamlanmıştır.

Bu bölümde, yürütülen çalışma kapsamında edilen sonuçlar özetlenmiştir.

- Katkısız BCP, dört farklı oranda (Ca/La = 11/1, 9/1, 7/1 ve 5/1) La katkısı ve üç farklı oranda (Sm/Ca = 0.02, 0.05 ve 0.1) Sm katkısı içeren BCP tozları sol-jel ve ısıl işlem proseslerinin ardından sentezlenmiş ve yapılan XRD ve FTIR analizleri sonucunda HA ve β-TCP'nin oluştuğu gözlemlenmiştir.
- Üretilen La katkılı BCP tozlarının ortalama partikül boyutu La oranın artmasıyla artış, Sm katkılı BCP tozlarının ortalama partikül boyutu Sm oranının artmasıyla azalış göstermiştir.
- Üretilen kompozit doku iskelelerinin SEM analiz sonuçlarında belirli miktardaki La ve Sm katkısının gözenek oluşumuna olumlu yönde etkilediği, K3-L4B ve K3-S3B doku iskelelerinin açık gözenek yapısına sahip olduğu belirlenmiştir.
- La ve Sm katkı oranlarının artmasıyla kompozit doku iskelelerinin basma dayanımları da artmıştır. Doku iskeleleri için önemli bir parametre olan mekanik özelliklerin geliştirildiği görülmüştür.
- Yapay vücut sıvısında çeşitli süreler ile bekletilen doku iskelelerine uygulanan SEM ve EDS analizleri sonucunda, tüm numunelerde ilk günden itibaren hidroksiapatit tabakası oluştuğu belirlenmiş ve numunelerin biyoaktiflik özelliğe sahip oldukları belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

[1] **Safari, B., Aghanejad, A., Roshangar, L., Davaran, S**. (2021). Osteogenic effects of the bioactive small molecules and minerals in the scaffold-based bone tissue engineering, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *198*, 111462.

[2] **Kundu, K., Afshar, A., Katti, D. R., Edirisinghe, M., Katti, K. S.** (2021). Composite nanoclay-hydroxyapatite-polymer fiber scaffolds for bone tissue engineering manufactured using pressurized gyration, *Composites Science and Technology*, *202*, 108598.

[3] **Pereira, H., Cengiz, I. F., Maia, F. R., Bartolomeu, F., Oliveira, J. M., Reis, R. L., Silva, F. S.** (2020). Physicochemical properties and cytocompatibility assessment of non-degradable scaffolds for bone tissue engineering applications, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *112*, 103997.

[4] **Haleem, A., Javaid, M., Khan, R. H., Suman, R.** (2020). 3D printing applications in bone tissue engineering, *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma, 11*, S118-S124.

[5] **Han, X., Xu, H., Che, L., Sha, D., Huang, C., Meng, T., Song, D.** (2020). Application of Inorganic Nanocomposite Hydrogels in Bone Tissue Engineering, *IScience*, *23* (12), 101845.

[6] **Prasad, A.** (2021). State of art review on bioabsorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Today: Proceedings*, *44*, 1391–1400**.**

[7] **Yazdanian, M., Tabesh, H., Houshmand, B., Tebyanian, H., Soufdoost, R. S., Tahmasebi, E., Karami, A., Ghullame, S.** (2020). Fabrication and properties of βTCP/Zeolite/Gelatin scaffold as developed scaffold in bone regeneration: in vitro and in vivo studies, *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, *40* (4), 1626–1637.

[8] **Alvarez, K., Nakajima, H.** (2009). Metallic Scaffolds for Bone Regeneration, *Materials*, *2* (3), 790–832.

[9] **Babilotte, J., Martin, B., Guduric, V., Bareille, R., Agniel, R., Roques, S., Héroguez, V., Dussauze, M., Gaudon, M., Le Nihouannen, D., Catros, S.** (2021). Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Science & Engineering C*, *118*, 111334.

[10] **Chen, S., Zhao, X., Du, C.** (2018). Macroporous poly (L-lactic acid) /chitosan nanofibrous scaffolds through cloud point thermally induced phase separation for enhanced bone regeneration, *European Polymer Journal*, *109* (381), 303–316.

[11] **Deepthi, S., Venkatesan, J., Kim, S. K., Bumgardner, J. D., Jayakumar, R.** (2016). An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, *93*, 1338–1353.

[12] **Parvizifard, M., Karbasi, S.** (2020). Physical, mechanical and biological performance of PHB-Chitosan/ MWCNTs nanocomposite coating deposited on bioglass based scaffold: Potential application in bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules, 152*, 645–662.

[13] **Lima, D. B., de Souza, M. A. A., de Lima, G. G., Ferreira Souto, E. P., Oliveira, H. M. L., Fook, M. V. L., de Sá, M. J. C.** (2020). Injectable bone substitute based on chitosan with polyethylene glycol polymeric solution and biphasic calcium phosphate microspheres, *Carbohydrate Polymers*, *245*, 116575.

[14] **Wu, C., Chang, J.** (2006). A Novel Akermanite Bioceramic: Preparation and Characteristics, *Journal of Biomaterials Applications, 21* (2), 119–129.

[15] **Zhu, D., Lu, B., Yang, Q., Yu, H., Liu, P., Yin, J., Chen, Y., Huang, Y., Ke, Q., Zhang, C., Guo, Y., Gao, Y.** (2021). Lanthanum-doped mesoporous bioglasses/chitosan composite scaffolds enhance synchronous osteogenesis and angiogenesis for augmented osseous regeneration, *Chemical Engineering Journal*, *405*, 127077.

[16] **Golafshan, N., Alehosseini, M., Ahmadi, T., Talebi, A., Fathi, M., Kharaziha, M., Orive, G., Castilho, M., Dolatshahi-Pirouz, A.** (2021). Combinatorial fluorapatite-based scaffolds substituted with strontium, magnesium and silicon ions for mending bone defects, *Materials Science and Engineering C*, *120*, 111611.

[17] **Qiao, H., Zou, Q., Yuan, C., Zhang, X., Han, S., Wang, Z., Bu, X., Tang, H., Huang, Y.** (2018). Composite coatings of lanthanum-doped fluor-hydroxyapatite and a layer of strontium titanate nanotubes: fabrication, bio-corrosion resistance, cytocompatibility and osteogenic differentiation, *Ceramics International*, *44* (14), 16632–16646.

[18] **Yin, J., Yu, J., Ke, Q., Yang, Q., Zhu, D., Gao, Y., Guo, Y., & Zhang, C.** (2019). La-Doped biomimetic scaffolds facilitate bone remodelling by synchronizing osteointegration and phagocytic activity of macrophages, *Journal of Materials Chemistry B, 7* (19), 3066–3074.

[19] **Chiang, S. S., Chen, J. B., Yang, W., C.,** (2005). Lanthanum carbonate (Fosrenol) efficacy and tolerability in the treatment of hyperphosphatemic patients with end-stage renal disease, *Clinical nephrology, 63 (6),* 461–470.

[20] **Motameni, A., Alshemary, A. Z., Dalgic, A. D., Keskin, D., Evis, Z.** (2020). Lanthanum doped dicalcium phosphate bone cements for potential use as filler for bone defects, *Materials Today Communications*, *26*, 101774.

[21] **Motameni, A., Dalgic, A. D., Alshemary, A., Z., Keskin, D., Evis, Z.,** (2020). Structural and Biological Analysis of Mesoporous Lanthanum Doped βTCP For Potential Use as Bone Graft Material, *Materials Today Communications*, *23*, 101151.

[22] **Xie, L., Luo, D., Zhu, Y., Xu, C., Chen, G. X., Xu, R. J., Zhou, X. Q., Li, Y.** (2020). Monitoring of hydroxyapatite conversion by luminescence

intensity and color during mineralization of Sm^{3+}-doped β-dicalcium silicate, *Journal of Luminescence*, *226*, 117468.

[23] **Zhang, Y., Wang, X., Su, Y., Chen, D., Zhong, W.** (2016). A doxorubicin delivery system: Samarium/mesoporous bioactive glass/alginate composite microspheres, *Materials Science and Engineering C*, *67*, 205–213.

[24] **Iconaru, S. L., Groza, A., Gaiaschi, S., Rokosz, K., Raaen, S., Ciobanu, S. C., Chapon, P., Predoi, D.** (2020). Antimicrobial properties of samarium doped hydroxyapatite suspensions and coatings, *Coatings*, *10* (11), 1–18.

[25] **Morais, D. S., Coelho, J., Ferraz, M. P., Gomes, P. S., Fernandes, M. H., Hussain, N. S., Santos, J. D., Lopes, M. A.** (2014). Samarium doped glass-reinforced hydroxyapatite with enhanced osteoblastic performance and antibacterial properties for bone tissue regeneration, *Journal of Materials Chemistry B*, *2* (35), 5872–5881.

[26] **Marie, P.** (1992). Physiology of bone tissue, *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, *7* (6), 17–24.

[27] **Valtanen, R. S., Yang, Y. P., Gurtner, G. C., Maloney, W. J., Lowenberg, D. W.** (2020). Synthetic bone tissue engineering graft substitutes: What is the future, *Injury*, *52*, S72–S77.

[28] **Stevens, M., M.** (2008). Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Today*, *11*, 18-25.

[29] **Barrère, F., Blitterswijk, C., Groot, K.** (2006). Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics, *International Journal of Nanomedicine*, *1* (3), 317–332.

[30] **Salgado, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L.** (2004). Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends, *Macromolecular Bioscience*, *4*, 743–765.

[31] **Murugan, R., Ramakrishna, S.** (2005). Development of nanocomposites for bone grafting, *Composites Science and Technology*, *65* (15-16), 2385–2406.

[32] **Amorim, S., Reis, C. A., Reis, R. L., Pires, R. A.** (2021). Extracellular Matrix Mimics Using Hyaluronan-Based Biomaterials, *Trends in Biotechnology*, *39* (1), 90-104.

[33] **Lett, J. A., Sundareswari, M., Ravichandran, K.** (2016). Porous hydroxyapatite scaffolds for orthopedic and dental applications - the role of binders, *Materials Today: Proceedings*, *3*, 1672–1677.

[34] **Singh, B. N., Veeresh, V., Mallick, S. P., Sinha, S., Rastogi, A., Srivastava, P.,** (2020). Generation of scaffold incorporated with nanobioglass encapsulated in chitosan/chondroitin sulfate complex for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, *153*, 1–16.

[35] **Adithya, S. P., Sidharthan, D. S., Abhinandan, R., Balagangadharan, K., Selvamurugan, N.** (2020). Nanosheets-incorporated bio-composites containing natural and synthetic polymers/ceramics for bone tissue

engineering, *International Journal of Biological Macromolecules, 164*, 1960–1972.

[36] **Porter, J. R., Ruckh, T. T., Popat, K. C.** (2009). Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies, *Biotechnology Progress, 25* (6), 1539–1560.

[37] **Mutlu, B.** (2019). *Doku Mühendisliği Uygulamaları için Mikroakışkan Sistemi Kullanarak Sodyum Aljinat Film Üretimi.* (Yüksek Lisans Tezi). Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

[38] **Murphy, C. M., O'Brien, F. J., Little, D. G., Schindeler, A.** (2013). Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad, *European Cells and Materials, 26*, 120–132.

[39] **Chocholata, P., Kulda, V., Babuska, V.** (2019). Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration, *Materials, 12* (4), 568.

[40] **O'Brien, F., J.,** (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today: Proceedings, 14* (3), 8–95.

[41] **Woodard, J. R., Hilldore, A. J., Lan, S. K., Park, C. J., Morgan, A. W., Eurell, J. A. C., Clark, S. G., Wheeler, M. B., Jamison, R. D., Johnson, A. J. W.** (2006). The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity, *Biomaterials, 28* (1), 45–54.

[42] **Pecqueux, F., Tancret, F., Payraudeau, N., Bouler, J. M.** (2010). Influence of microporosity and macroporosity on the mechanical properties of biphasic calcium phosphate bioceramics: Modelling and experiment, *Journal of the European Ceramic Society, 30* (4), 819–829.

[43] **Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., Ramirez-Vick, J. E.** (2014). Scaffold Design for Bone Regeneration, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 14* (1), 15–56.

[44] **Lee, S., Shin, H.,** (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews, 59* (4-5), 339–359.

[45] **Bulut, B.** (2019). *Kemik Doku Uygulamaları için TiO_2 / Akermanit Katkılı Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu*. (Yüksek Lisans Tezi). Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

[46] **Kıyıcı, İ. A.** (2011). *Plazma Püskürtme Yöntemiyle Üretilen Hidroksiapatit-Cam Kompozit Kaplamaların Karakterizasyonu.* (Yüksek Lisans Tezi). Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[47] **Biswal, T., BadJena, S. K., Pradhan, D.** (2020). Sustainable biomaterials and their applications: A short review, *Materials Today: Proceedings, 30* (Part 2), 274-282.

[48] **Masaeli, R., Zandsalimi, K., Tayebi, L.** (2019). Biomaterials Evaluation: Conceptual Refinements and Practical Reforms, *Therapeutic Innovation and Regulatory Science, 53* (1), 1–8.

[49] **Sumita, M., Hanawa, T., Teoh, S. H.** (2004). Development of nitrogen-containing nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials—review, *Materials Science and Engineering C, 24* (6-8), 753–760.

[50] **Muruve, N. G. G., Cheng, Y. F., Feng, Y., Liu, T., Muruve, D. A., Hassett, D. J., Irvin, R. T.** (2016). Peptide-based biocoatings for corrosion protection of stainless steel biomaterial in a chloride solution, *Materials Science and Engineering C, 68*, 695–700.

[51] **Çetiner, D.** (2015). *Biyomedikal Uygulamalar için ASTM F75 Kobalt-Krom Alaşımının Yüzey Modifikasyonu*. (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[52] **Ibrahim, M. Z., Sarhan, A. A. D., Kuo, T. Y., Yusof, F., Hamdi, M.** (2019). Characterization and hardness enhancement of amorphous Fe-based metallic glass laser cladded on nickel-free stainless steel for biomedical implant application, *Materials Chemistry and Physics, 235*, 121745.

[53] **Challa, V. S. A., Nune, K. C., Gong, N., Misra, R. D. K.** (2020). The significant impact of mechanically-induced phase transformation on cellular functionality of biomedical austenitic stainless steel, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 108*, 103815.

[54] **Kargozar, S., Ramakrishna, S., Mozafari, M.** (2019). Chemistry of biomaterials: future prospects, *Current Opinion in Biomedical Engineering, 10*, 181–190.

[55] **Güven, Ş., K.** (2014). Biyouyumluluk ve Biyomalzemelerin Seçimi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi, 2* (3), 303–311.

[56] **Kahraman, G.** (2019). *Titanyum - Hidroksiapatit Kompozitlerinin Toz Metalurjisi Yöntemi ile Üretimi ve Karakterizasyonu.* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[57] **Dhivya, S., Ajita, J., Selvamurugan, N.** (2015). *Metallic Nanomaterials for Bone Tissue Engineering, 11* (10), 1675–1700.

[58] **Eivazzadeh-Keihan, R., Bahojb Noruzi, E., Khanmohammadi Chenab, K., J afari, A., Radinekiyan, F., Hashemi, S. M., Ahmadpour, F., Behboudi, A., Mosafer, J., Mokhtarzadeh, A., Maleki, A., Hamblin, M. R.** (2020). Metal-based nanoparticles for bone tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 14* (12), 1687–1714.

[59] **Tripathi, A., Saravanan, S., Pattnaik, S., Moorthi, A., Partridge, N., C., Selvamurugan, N.** (2012). Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules, 50* (1), 294–299.

[60] **Schatkoski, V. M., Larissa do Amaral Montanheiro, T., Canuto de Menezes, B. R., Pereira, R. M., Rodrigues, K. F., Ribas, R. G., Morais da Silva, D., Thim, G. P.** (2021). Current advances concerning the most cited metal ions doped bioceramics and silicate-based bioactive glasses

for bone tissue engineering, *Ceramics International*, *47* (3), 2999–3012.

[61] **Zhang, X., Huang, Y., Wang, B., Chang, X., Yang, H., Lan, J., Wang, S., Qiao, H., Lin, H., Han, S., Guo, Y., Zhang, X.** (2020). A functionalized Sm/Sr doped TiO_2 nanotube array on titanium implant enables exceptional bone-implant integration and also self-antibacterial activity, *Ceramics International*, *46* (10), 14796–14807.

[62] **El Khouri, A., Elaatmani, M., Della Ventura, G., Sodo, A., Rizzi, R., Rossi, M., Capitelli, F.** (2017). Synthesis, structure refinement and vibrational spectroscopy of new rare-earth tricalcium phosphates Ca9RE(PO4)7 (RE = La, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Tm, Yb), *Ceramics International*, *43* (17), 15645–15653.

[63] **Neacsu, I. A., Stoica, A. E., Vasile, B. S., Andronescu, E.** (2019). Luminescent hydroxyapatite doped with rare earth elements for biomedical applications, *Nanomaterials*, *9* (2), 239.

[64] **Tang, Y, Q., Wang, Q. Y., Ke, Q. F., Zhang, C. Q., Guan, J. J., Guo, Y. P.** (2020). Mineralization of ytterbium-doped hydroxyapatite nanorod arrays in magnetic chitosan scaffolds improves osteogenic and angiogenic abilities for bone defect healing, *Chemical Engineering Journal*, *387* (2019), 124166.

[65] **Hu, H., Zhao, P., Liu, J., Ke, Q., Zhang, C., Guo, Y., Ding, H.** (2018). Lanthanum phosphate/chitosan scaffolds enhance cytocompatibility and osteogenic efficiency via the Wnt/β-catenin pathway, *Journal of Nanobiotechnology*, *16* (98), 1–13.

[66] **Jodati, H., Güner, B., Evis, Z., Keskin, D., Tezcaner, A.** (2020). Synthesis and characterization of magnesium-lanthanum dual doped bioactive glasses, *Ceramics International*, *46* (8), 10503–10511.

[67] **El-Meliegy, E., Farag, M. M., El-Kady, A. M., Mohamed, M. S., Abdelhakim, H. K., Moaness, M.** (2017). Evaluation of solubility and cytotoxicity of lanthanum-doped phosphate glasses nanoparticles for drug delivery applications, *Journal of Non-Crystalline Solids*, *475* (2017), 59–70.

[68] **Wieszczycka, K., Staszak, K., Woźniak-Budych, M. J., Jurga, S.** (2019). Lanthanides and tissue engineering strategies for bone regeneration, *Coordination Chemistry Reviews*, *388*, 248–267.

[69] **Ghosh, R., Sarkar, R., Paul, S.** (2016). Development of machinable hydroxyapatite-lanthanum phosphate composite for biomedical applications, *Materials and Design*, *106*, 161–169.

[70] **Guo, D. G., Wang, A. H., Han, Y., Xu, K. W.** (2009). Characterization, physicochemical properties and biocompatibility of La-incorporated apatites, *Acta Biomaterialia*, *5* (9), 3512–3523.

[71] **Jinga, S. I., Anghel, A. M., Brincoveanu, S. F., Bucur, R. M., Florea, A. D., Saftau, B. I., Stroe, S. C., Zamfirescu, A. I., Busuioc, C.** (2021). Ce/sm/sr-incorporating ceramic scaffolds obtained via sol-gel route, *Materials*, *14* (6), 1–18.

[72] **Ciobanu, C. S., Iconaru, S. L., Popa, C. L., Motelica-Heino, M., Predoi, D.** (2015). Evaluation of Samarium Doped Hydroxyapatite, Ceramics for Medical Application: Antimicrobial Activity, *Journal of Nanomaterials, 2015*, 849216.

[73] **Balamurugan, A., Sudha, M., Surendhiran, S., Anandarasu, R., Ravikumar, S., Syed Khadar, Y. A.** (2019). Hydrothermal synthesis of samarium (Sm) doped cerium oxide (CeO_2) nanoparticles: Characterization and antibacterial activity, *Materials Today: Proceedings*, *26*, 3588–3594.

[74] **Asadi, N., Bakhshayesh, A. R., Davaran, S., Akbarzadeh, A.** (2020). Common Biocompatible Polymeric Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Materials Chemistry and Physics*, *242*, 122528.

[75] **Shanmugam, K., Sahadevan, R.** (2018). Fundamental Biomaterials: Ceramics, 2nd ed., Woodhead Publishing, India, 1–46.

[76] **Bose, S., Roy, M., Bandyopadhyay, A.** (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends in Biotechnology*, *30* (10), 546–554.

[77] **Qu, H., Fu, H., Han, Z., Sun, Y.** (2019). Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Advances*, *9* (45), 26252–26262.

[78] **Tutkun, L.** (2010). *Biyobozunur Kompozit Kemik Doku İskeleleri: Polimerik Fiber/Malzeme Destekli Kriyojeller.* (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Ensititüsü, Ankara.

[79] **Soundarya, S. P., Menon, A. H., Chandran, S. V., Selvamurugan, N.** (2018). Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques, *International Journal of Biological Macromolecule*s, *119*, 1228–1239.

[80] **Saravanan, S., Leena, R., S., Selvamurugan, N.** (2016). Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecule*s, *93* (Part B), 1354–1365.

[81] **LogithKumar, R., KeshavNarayan, A., Dhivya, S., Chawla, A., Saravanan, S.** (2016). A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering, *Carbohydrate Polymers*, *151*, 172–188.

[82] **Olad, A., Hagh, H., B., K., Mirmohseni, A., Azhar, F., F.,** (2019). Graphene oxide and montmorillonite enriched natural polymeric scaffold for bone tissue engineering, *Ceramics International*, *45* (12), 15609–15619.

[83] **Sivashankari, P., R., Prabaharan, M.,** (2020). Three-dimensional porous scaffolds based on agarose/chitosan/graphene oxide composite for tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecule*s, *146*, 222–231.

[84] **Rinaudo, M.** (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, *31* (7), 603-632

[85] **Dong, X., Cheng, Q., Long, Y., Xu, C., Fang, H., Chen, Y., Dai, H.** (2020). A chitosan based scaffold with enhanced mechanical and biocompatible performance for biomedical applications, *Polymer Degradation and Stability*, *181*, 109322.

[86] **Levengood, S. K. L., Zhang, M.** (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, *Journal of Materials Chemistry B, 2* (21), 3161–3184.

[87] **Duman, Ş., Bulut, B.** (2021). Effect of akermanite powders on mechanical properties and bioactivity of chitosan-based scaffolds produced by 3D-bioprinting, *Ceramics International*, *4 7*(10), 13912–13921.

[88] **Li, T. T., Zhang, Y., Ren, H. T., Peng, H. K., Lou, C. W., Lin, J. H.** (2021). Two-step strategy for constructing hierarchical pore structured chitosan–hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Carbohydrate Polymers*, *260* (2021), 117765.

[89] **Yılmaz, P.** (2019). *Productıon and Characterization of Hydroxyapatite-Graphene Oxide-Chitosan Scaffold for Bone Tissue Engineering Application.* (Yüksek Lisans Tezi). Boğaziçi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[90] **Silvestro, I., Sergi, R., D'Abusco, A. S., Mariano, A., Martinelli, A., Piozzi, A., Francolini, I.** (2021). Chitosan scaffolds with enhanced mechanical strength and elastic response by combination of freeze gelation, photo-crosslinking and freeze-drying, *Carbohydrate Polymers*, *267* (2021), 118156.

[91] **Jiang, Z., Zhang, K., Du, L., Cheng, Z., Zhang, T., Ding, J., Li, W., Xu, B., Zhu, M.** (2021). Construction of chitosan scaffolds with controllable microchannel for tissue engineering and regenerative medicine, *Materials Science and Engineering: C*, *126* (2021), 112178.

[92] **Tanase, C. E., Popa, M. I., Verestiuc, L.** (2011). Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates, *Materials Letters*, *65* (11), 1681–1683.

[93] **Sedghi, R., Shaabani, A., Sayyari, N.** (2020). Electrospun triazole-based chitosan nanofibers as a novel scaffolds for bone tissue repair and regeneration, *Carbohydrate Polymers*, *230* (2020), 115707.

[94] **Vaidhyanathan, B., Vincent, P., Vadivel, S., Karuppiah, P., AL-Dhabi, N. A., Sadhasivam, D. R., Vimalraj, S., Saravanan, S.** (2021). Fabrication and Investigation of the Suitability of Chitosan-Silver Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications, *Process Biochemistry*, *100* (2021), 178–187.

[95] **Pinto, R. V., Gomes, P. S., Fernandes, M. H., Costa, M. E. V., Almeida, M. M.** (2020). Glutaraldehyde-crosslinking chitosan scaffolds reinforced with calcium phosphate spray-dried granules for bone tissue applications, *Materials Science and Engineering C*, *109* (2020), 110557.

[96] **Farid, S. B. H.** (2019). Bioceramics: for materials science and engineering, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 1-37.

[97] **Kükürtcü, B.** (2008). *Biyoaktif Cam ve Cam-Seramik Malzemelerin Üretimi ve Yapay Vücut Sıvısı İçerisimndeki Davranımlarının İncelenmesi*.(Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[98] **Gul, H., Khan, M., Khan, A. S.** (2020). Bioceramics: Types and clinical applications in *Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 53–83.

[99] **Samavedi, S., Whittington, A. R., Goldstein, A. S.** (2013). Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, *Acta Biomaterialia, 9* (9). 8037–8045.

[100] **Sprio, S., Tampieri, A., Dapporto, M., Iafisco, M., Montesi, M.** (2020). Bioceramics in Regenerative Medicine, *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 1–13.

[101] **Zığındere, O.** (2018). *Kalsiyum Fosfat Esaslı Biyoseramik Nano Tozların Glisin-Nitrat Yöntemiyle Üretimi ve Karakterizasyonu.* (Yüksek Lisans Tezi). Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.

[102] **Altunordu, G.** (2019). *Development and Characterization Of (Carbonated) Hydroxyapatite, Akermanite Involving Polycaprolactone Scaffolds.* (Yüksek Lisans Tezi). Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[103] **Demirkol, N.** (2013). *Koyun Hidroksiapatit Esaslı Kompozitlerin Üretimi ve Karakterizasyonu.* (Doktora Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[104] **Mohd Pu'ad, N. A. S., Koshy, P., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., Lee, T. C.** (2019). Syntheses of hydroxyapatite from natural sources, *Heliyon, 5* (5), e01588.

[105] **Fragal, E. H., Cellet, T. S. P., Fragal, V. H., Companhoni, M. V. P., Ueda-Nakamura, T., Muniz, E. C., Silva, R., Rubira, A. F.** (2016). Hybrid materials for bone tissue engineering from biomimetic growthof hydroxiapatite on cellulose nanowhiskers, *Carbohydrate Polymers, 152*, 734–746

[106] **Iqbal, N., Abdul Kadir, M. R., Iqbal, S., AbdRazak, S. I., Rafique, M. S., Bakhsheshi-Rad, H. R., Idris, M. H., Khattak, M. A., Raghavendran, H. R. B., Abbas, A. A.** (2016). Nano-hydroxyapatite reinforced zeolite ZSM composites: A comprehensive study on thestructural and in vitro biological properties, *Ceramics International*, *42* (6), 7175–7182.

[107] **Zhao, H., Ma, L., Gao, C., Wang, J., Shen, J.** (2009). Fabrication and properties of injectable β-tricalcium phosphate particles/fibrin gel composite scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering C, 29* (3), 836–842.

[108] **Pan, C., Sun, X., Xu. G., Su, Y., Liu, D.** (2020). The effects of β-TCP on mechanical properties, corrosion behavior and biocompatibility of β-TCP/Zn-Mg composites, *Materials Science & Engineering C, 108*, 110397.

[109] **Özgenç, Ö.** (2019). *Köpeklerde Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin β-TCP ve β-TCP /Kollajen İçerikli Biyomateryallerde Kemiğe Farklılaştırılması.* (Doktora Tezi). Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[110] **Prem Ananth, K., Guo, B., Zhang, C., Wang, W., Zhou, P., Bai, J.** (2020). Investigation of biphasic calcium phosphate (BCp)/polyvinylpyrrolidone (PVp) /graphene oxide (GO) composite for biomedical implants, *Ceramics International, 46* (15), 24413–24423.

[111] **Ramay, H. R. R., Zhang, M.** (2004). Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering, *Biomaterials*, 25 (12), 5171–5180.

[112] **Bouler, J. M., Pilet, P., Gauthier, O., Verron, E.** (2017). Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response, *Acta Biomaterialia, 53*, 1–12.

[113] **Bashah, N. S. K., Noor, A. F., M.** (2019). The influence of silicon addition in modulation of HA/TCP ratio in biphasic calcium phosphate, *Materials Today: Proceedings, 16* (Part 4), 1796–1803.

[114] **Yarlılar, Ş. G.** (2019). *Bor Katkılı Bifazik Kalsiyum Fosfat'ın Biyouyumluluğunun Araştırılması.* (Yüksek Lisans Tezi). Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.

[115] **Marques, C. F., Olhero, S., Abrantes, J. C. C., Marote, A., Ferreira, S., Vieira, S. I., Ferreira, J. M. F. (**2017). Biocompatibility and antimicrobia activity of biphasic calcium phosphate powders doped with metal ions for regenerative medicine, *Ceramics International*, *43* (17), 15719–15728.

[116] **Zhu, Q., Ablikim, Z., Chen, T., Cai, Q., Xia, J., Jiang, D.** (2017). The preparation and characterization of HA/β-TCP biphasic ceramics from fish bones, *Ceramics International*, *43* (15), 12213–12220.

[117] **Piccirillo, C., Silva, M. F., Pullar, R. C., Cruz, I. B., Jorge, R., Pintado, R., Castro, P. M. L.** (2013). Extraction and characterisation of apatite- and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones, *Materials Science and Engineering C*, *33* (1), 103–110.

[118] **Gao, C., Yang, B., Hu, H., Liu, J., Shuai, C., Peng, S.** (2013). Enhanced sintering ability of biphasic calcium phosphate by polymers used for bone scaffold fabrication, *Materials Science and Engineering C*, *33* (7), 3802–3810.

[119] **Ramezani, S., Emadi, R., Kharaziha, M., Tavangarian, F.** (2017). Synthesis, characterization and in vitro behavior of nanostructured diopside/biphasic calcium phosphate scaffolds, *Materials Chemistry and Physics*, *186*, 415–425.

[120] **Haider, A., Haider, S., Kummara, M. R., Kamal, T., Alghyamah, A., Iftikhar, F. J., Bano, B., Khan, N., Afridi, A., Han, S. S., Alrahlah, A., Khan, R.** (2020). Advances in the scaffolds fabrication techniques using biocompatible polymers and their biomedical application: A technical and statistical review, *Journal of Saudi Chemical Society*, *24* (2), 186–215.

[121] **Shikhaliyeva, İ.** (2015). *Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının Bor Katkılı Hap-Kaplı Kitosan Doku İskelelerinde İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[122] **Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S.** (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, *63* (15), 2223–2253.

[123] **Evren, G.** (2020). *Polistiren Temelli Nanoliflerin Elektroeğirme ile Üretilmesi, Biyolojik Moleküllerle Modifikasyonu ve Biyosensör Hazırlanmasında Uygulamaları.* (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

[124] **Çelik, R. H.** (2019). *Grafen Oksit Temelli Polimerik Nanofibröz Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu.* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[125] **Can, N., Ersoy, M., S.** (2014). Nanolif yapili polimerik doku iskeleleri, *Tekstil ve Mühendis*, *21* (95), 38–50.

[126] **Wang, C., Jiang, W., Zuo, W., Han, G., Zhang, Y.** (2018). Effect of heat-transfer capability on micropore structure of freeze-drying alginate scaffold, *Materials Science & Engineering C*, *93*, 944–949.

[127] **Tanir, T. E., Hasirci, V., Hasirci, N.** (2015). Preparation and Characterization of Chitosan and PLGA-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *Polymer Composites*, *36* (10), 1917–1930.

[128] **Grumezescu, A.** (2016). Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering, *5*, 141–172.

[129] **Oyane, A., Kim, H., Furuya, T., Kokubo, T., Miyazaki, T., Nakamura, T.** (2003). Preparation and assessment of revised simulated body fluids, *Journal of Biomedical Materials Research*, *65A* (2), 188–195.

[130] **Kokubo, T., Takadama, H.** (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*, *27* (15), 2907–2915.

[131] **Karakaya, C.** (2018). *Stronsiyum Katkısının Biyocam Doku İskelesinin Özelliklerine Olan Etkisinin İncelenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi). Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.

[132] **Albayrak, O. (2016).** Structural and mechanical characterization of boron doped biphasic calcium phosphate produced by wet chemical method and subsequent thermal treatment, *Materials Characterization*, 113, 82–89.

[133] **Iconaru, S. L., Motelica-Heino, M., Predoi, D.** (2013). Study on europium-doped hydroxyapatite nanoparticles by fourier transform infrared spectroscopy and their antimicrobial properties. *Journal of Spectroscopy*, *1* (1).

[134] **Ravindran, A., Singh, A., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A.** (2010). Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *76* (1), 32–37.

[135] **Shirkhanzadeh, M., Azadegan, M., Liu, G. Q.** (1995). Bioactive delivery systems for the slow release of antibiotics: incorporation of Ag+ ions into micro-porous hydroxyapatite coatings. *Materials Letters*, *24* (1–3), 7–12.

[136] **Sun, T., Khan, T. H., Sultana, N.** (2014). Fabrication and in vitro evaluation of nanosized hydroxyapatite/chitosan- based tissue engineering scaffolds. *Journal of Nanomaterials*, *2014*.

[137] **Gritsch, L., Maqbool, M., Mouriño, V., Ciraldo, F. E., Cresswell, M., Jackson, P. R., Lovell, C., Boccaccini, A. R.** (2019). Chitosan/hydroxyapatite composite bone tissue engineering scaffolds with dual and decoupled therapeutic ion delivery: Copper and strontium. *Journal of Materials Chemistry B*, *7* (40), 6109–6124.

[138] **Kumar, P. R., Maharajan, T. M., Prabu, A. P., Santhana Kumar, K., Kumar, R., Maharajan, M., Chinnasamy, M., Pitchiah Prabu, A., Arockia Suthagar, J.** (2019). Hydroxyl radical scavenging activity of La2O3 nanoparticles. *The Pharma Innovation Journal*, *8* (5), 759–763.

[139] **Toibah, A. R., Sopyan, I., Yuhazri, Y. M., Jeefferie, R. A., Nooririnah, O.** (2012). FTIR study on phase behavior of magnesium-doped biphasic calcium phosphate synthesized via sol-gel method. *AIP Conference Proceedings*, *1455*, 97–103.

[140] **Han, Y. L. J., Loo, S. C. J., Phung, N. T., Boey, F., Ma, J.** (2008). Controlled size and morphology of EDTMP-doped hydroxyapatite nanoparticles as model for 153Samarium-EDTMP doping. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *19* (9), 2993–3003.

[141] **Murphy, S., Boyd, D., Moane, S., Bennett, M.** (2009). The effect of composition on ion release from Ca-Sr-Na-Zn-Si glass bone grafts, *Journal of Material Science: Materials in Medicine, 20*, 2207-2214.

[142] **Queiroz, M. F., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sassaki, G. L., Rocha, H. A. O.** (2015). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? *Marine Drugs*, *13* (1), 141–158.

[144] **Liao, Y., Li, H., Shu, R., Chen, H., Zhao, L., Song, Z., Zhou, W.** (2020). Mesoporous Hydroxyapatite/Chitosan Loaded With Recombinant-Human Amelogenin Could Enhance Antibacterial Effect and Promote Periodontal Regeneration. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10* (April).

[145] **Nie, L., Wu, Q., Long, H., Hu, K., Li, P., Wang, C., Sun, M., Dong, J., Wei, X., Suo, J., Hua, D., Liu, S., Yuan, H., Yang, S.** (2019). Development of chitosan/gelatin hydrogels incorporation of biphasic calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *30* (17), 1636–1657.

[146] **Avci, M., Yilmaz, B., Tezcaner, A., & Evis, Z.** (2017). Strontium doped hydroxyapatite biomimetic coatings on Ti6Al4V plates. *Ceramics International*, *43* (12), 9431–9436.

[147] **Nandi, S., K., Kundu, B., Datta, S., De, D.K., Basu, D.** (2009). The repair of segmental bone defects with porous bioglass: An experimental study in goat, *Research in Veterinary Science*, *86*, 162-173.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Burak ÇEPER

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-Posta :

ÖĞRENİM DURUMU

Lisans: 2017, Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği (%100 İng.)

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Çeper, B., Bulut, B., Duman, Ş., Akben, K. H. (2021). Effects of Sm Doping on the Synthesis and Antibacterial Properties of BCP Bioceramics, 5th International Congress on Engineering and Technology Management, 24-25 April 2021– İstanbul– Turkey. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)