

T.C.  
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN  
SAF VE KLİNOPTİLOLİT KATKILI HİDROKSİAPATİT  
BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Tezi Hazırlayan  
Esmâ DALDİKEN

Tez Danışmanı  
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK

İkinci Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer KÜÇÜKDEVECİ

Nanobilim ve Nanoteknolojisi Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2024  
NEVŞEHİR



**T.C.  
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN  
SAF VE KLİNOPTİLOLİT KATKILI HİDROKSİAPATİT  
BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

**Tezi Hazırlayan  
Esmâ DALDİKEN**

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK**

**İkinci Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer KÜÇÜKDEVECİ**

**Nanobilim ve Nanoteknolojisi Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2024**

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK ve Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer KÜÇÜKDEVECİ danışmanlığında Esma DALDİKEN tarafından hazırlanan "**Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Saf ve Klinoptilolit Katkılı Hidroksiapatit Bileşiklerinin Sentezi ve Karakterizasyonu**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanobilim ve Nanoteknolojisi Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.../.../20..

## JÜRİ

Başkan :

Üye :

Üye :

## ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../20..

Prof. Dr. Cemal ÇARBOĞA  
Enstitü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİM SAYFASI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tüm bilgilerimi benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda kişilik olarak da bana çok şey katan Sayın Hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK ve Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer KÜÇÜKDEVECİ'ye,

Maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini hissettiren değerli eşim Ahmed DALDİKEN ve canım kızım Elif Gülce'ye,

Saos-2 hücre hattını temin eden Dr. Öğr Üyesi Mine Toker'e (ESOGÜ) ve doğal klinoptilolit örnek numunesini sağlayan Rota Madencilik (Gördes, Manisa) firmasına teşekkür ederim.

# KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN SAF VE KLİNOPTİLOLİT KATKILI HİDROKSİAPATİT BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Esmâ DALDİKEN

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ

Ocak 2024

## ÖZET

Kemik dokusunun temel inorganik bileşeni olan kalsiyum fosfat temelli hidroksiapatit (HA) bileşiği, yüksek biyouyumluluğu ve biyomimetik yapısı sayesinde Kemik Doku Mühendisliği'nde skafold ve dolgu malzemesi olarak yaygın şekilde kullanılan bir biyoseramiktir. HA büyük bir biyoaktif potansiyele sahip olmasına rağmen, sentetik HA'nın yüksek kristal stabilitesi onun *in-vivo* olarak biyoemilebilirliğini kısıtlamakta ve bu da dokuların iyileşme sürecini uzatmaktadır. Bu nedenle, hidroksiapatitin kristal özelliklerini ve biyoaktivitesini ayarlamak için farklı iyonik katkılarla ya da minerallerle zenginleştirme yönünde çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Son zamanlarda HA'ya katkı maddesi olarak çeşitli biyomimetik iyonlar oluşturan doğal minerallerden yararlanılmaktadır. Kemik Doku Mühendisliği'nde sentetik ve doğal zeolitler, anjiogenezi ve osteogenezi tetikleyen silikat bakımından zengin bileşimleri, gözenekli morfolojisi, yüksek yüzey alanı ve iyonik değişim kapasitesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Klinoptilolit (CLP), biyouyumlu bir aluminasilikat bazlı zeolittir ve sıklıkla biyomedikal uygulamalar için kullanılır. Bu çalışmada, %5, %10 ve %20 oranlarındaki ve CLP katkılı HA'in sol-jel metodu ile sentezi yapılarak farklı sıcaklıklarda (800°C, 950°C ve 1100°C) sinterlenmiştir. Üretilen saf ve CLP katkılı HA numuneleri çeşitli morfolojik, kimyasal, mekanik ve biyolojik analizler ile karakterize edilmiştir. Sol-jel yöntemi, hidroksiapatit sentez yöntemlerinden en başarılı sonuç alınan, işlem tekrarlanabilirliği ve kolaylığı yönünden çok sık tercih edilen yöntemdir. Sol-jel yöntemi reaktiflerin moleküler düzeyde karışması, homojen partiküller elde edilmesi, düşük sıcaklıkta gerçekleştirilebilmesi, basınç gerektirmemesi ve yüksek saflıkta ürün elde edilmesi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca bu proseste partikül boyutu

ve partikül şekli gibi özellikleri kontrol etmek mümkündür. SEM ve S-TEM ile yapılan morfolojik karakterizasyonlara bakıldığında, nano boyutlu çubuksu biyomimetik partiküller elde edilmiştir. İnce tabakalar halinde bulunan geniş CLP partikülleri üzerine ince HA partikülleri yapışmış formda yer almaktadır. CLP katkılı HA numuneleri, 950°C ve 1100°C'de camsı yapıda ve birbirine bağlı porozif bir mikro yapıya sahiptir. 800°C'de sinterlenen numunelerde %5, %10 ve %20 CLP katkısı kristalin yapıyı çok fazla etkilemediği ve bütün numunelerde saf HA fazının korunduğu görülmüştür. FT-IR ve XRD analiz sonuçları, katkılı numunelerde CLP konsantrasyonu arttıkça termal kararlılığın azalarak 950°C ve 1100°C'de tri-kalsiyum fosfat bileşiklerinin oluştuğunu göstermektedir. Biyouyumluluk ve sitotoksisite testleri, tüm CLP katkılarının hücre canlılığını olumlu yönde etkilediğini ve en yüksek konsantrasyondaki CLP katkısının en yüksek hücre canlılık oranına neden olduğunu göstermektedir. HA ve CLP katkılı HA'nın ölçülmüş olan BET sonuçları karşılaştırıldığında CLP katkısının, yüzey alanını ve gözenek boyutunu düşürdüğü görülmüştür. Ek olarak tüm örneklerin basınç dayanımı trabeküler kemik ve kortikal kemik basınç dayanımı değer aralığında olmasına rağmen en yüksek CLP oranı ve en yüksek sinterleme sıcaklığında maksimum mekanik dayanıma sahip olduğu tespit edilmiştir.

***Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği, Kemik, Seramik malzemeler, Klinoptilolit***

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK**

**İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer KÜÇÜKDEVECİ**

**Sayfa Adeti: 61**



**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PURE AND  
CLINOPTYLOLITE ADDED HYDROXIAPATITE COMPOUNDS FOR BONE  
TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS**

**(M. Sc. Thesis)**

**Esmâ DALDİKEN**

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF  
NATURAL AND APPLIED SCIENCE**

**January 2024**

**ABSTRACT**

Calcium phosphate-based hydroxyapatite (HA) compound, the basic inorganic component of bone tissue, is a bioceramics widely used as scaffold and filling material in Bone Tissue Engineering, thanks to its high biocompatibility and biomimetic structure. Although HA has a great bioactive potential, the high crystal stability of synthetic HA limits its bioabsorbability *in-vivo*, which prolongs the healing process of tissues. Therefore, diverse studies are being carried out to enrich hydroxyapatite with different ionic additives or minerals to adjust its crystal properties and bioactivity. Recently, natural minerals composed of various biomimetic ions have been used as additives to HA. Synthetic and natural zeolites are frequently preferred in Bone Tissue Engineering due to their silicate-rich compositions that trigger angiogenesis and osteogenesis, porous morphology, high surface area and ionic exchange capacity. Clinoptilolite (CLP) is a biocompatible aluminasilicate-based zeolite and is frequently used for biomedical applications. In this study, 5%, 10% and 20% CLP-doped HA was synthesized by the sol-gel method and sintered at different temperatures (800°C, 950°C and 1100°C). The produced pure and CLP doped HA samples have been characterized by various morphological, chemical, mechanical and biological analyses. The sol gel method, among the hydroxyapatite synthesis methods provides the most successful results and is frequently preferred due to its repeatability and ease of monitoring. The biggest advantages of the synthesis are that the reagents are mixed at the molecular level, homogeneous particles are obtained, it can be carried out at low temperatures, does not require pressure, and high purity products are obtained. It is also possible to control properties such as particle size and particle shape in this process. Considering

the morphological characterizations made with SEM and S-TEM, nano-sized rod-like biomimetic particles were obtained. Fine HA particles are adhered onto large CLP particles as thin layers. CLP-doped HA samples have a glassy and interconnected porous microstructure at 950°C and 1100°C. In the samples sintered at 800°C, it was observed that 5%, 10% and 20% CLP additives did not affect the crystalline structure much and the pure HA phase was preserved in all samples. FT-IR and XRD analyses results show that thermal stability decreases in doped samples as CLP concentration increases and tri-calcium phosphate compounds are formed in samples sintered at 950°C and 1100°C. Biocompatibility and cytotoxicity tests show that all CLP additives positively affect cell viability and the highest concentration of CLP additive causes the highest rate of cell viability. When the measured BET results of HA and CLP-doped HA were compared, it was seen that the CLP additive reduced the surface area and pore size. In addition, although the compressive strength of all samples was within the value range of trabecular bone and cortical bone compressive strength, it was determined that they had maximum mechanical strength at the highest CLP ratio sintered at the highest temperature.

***Keywords: Tissue engineering, bone, ceramic materials, hydroxyapatite, clinoptilolite.***

**Thesis Supervisor : Assist. Prof Dr. Fatma Zehra KOCAK,  
Co-supervisor : Assist.Prof Dr. Nilüfer KUCUKDEVECI  
Page Number: 61**

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLOLAR LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
İÇİNDEKİLER.....	xiv
1. BÖLÜM	
GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç ve Kapsam .....	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kemiğin Yapısı ve Özellikleri .....	3
2.1.1. Kemiğin fizyolojik ve kimyasal yapısı .....	3
2.1.2. Kemiğin biyomekaniğine etki eden faktörler .....	6
2.1.3. Yeni kemik oluşumu (Ossifikasyon) .....	6
2.1.3.1. Ossifikasyon çeşitleri .....	6
2.1.3.2. Kemik yapısını oluşturan hücreler .....	7
2.1.3.3. Kemiğin yeniden oluşması (Remodeling) .....	8
2.2. Doku Mühendisliği .....	10
2.2.1. Doku mühendisliğinin tanımı ve uygulama alanları .....	10

2.2.2.	Osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteointegrasyon .....	10
2.3	Biyomalzemeler .....	11
2.3.1.	Biyomalzemelerin tanımı .....	11
2.3.2.	Biyomalzemelerin özellikleri .....	11
2.3.3.	Biyomalzemelerin kullanım alanları .....	12
2.3.4.	Biyomalzemelerin sınıflandırılması .....	13
2.3.4.1.	Metalik biyomalzemeler .....	13
2.3.4.2.	Polimerik biyomalzemeler .....	13
2.3.4.3.	Seramik biyomalzemeler .....	14
2.4.	Hidroksiapatit .....	16
2.4.1.	Hidroksiapatit'in genel özellikleri .....	16
2.4.2.	Hidroksiapatit'in kullanım alanları .....	17
2.4.3.	Hidroksiapatit'in yapısı .....	17
2.4.4.	Hidroksiapatit'in biyomimetik iyon yer değiştirmeleri .....	18
2.4.4.1.	Karbonat .....	19
2.4.4.2.	Silikat .....	19
2.4.4.3.	Magnezyum .....	20
2.4.4.4.	Florür .....	20
2.4.5.	Hidroksiapatit üretim yöntemleri .....	20
2.4.5.1.	Hidrotermal yöntem .....	20
2.4.5.2.	Kimyasal çöktürme yöntemi .....	21
2.4.5.3.	Sol-Jel yöntemi .....	21
2.5.	Zeolitler ve Klinoptilolit .....	21
2.5.1.	Zeolitlerin genel özellikleri .....	22

2.5.2.	Zeolitlerin hidroksiapatit ile birlikte kullanımı.....	22	
2.5.3.	Klinoptilolit.....	23	
2.5.3.1.	Klinoptilolit'in kristal yapısı ve özellikleri.....	23	
2.5.3.2.	Klinoptilolit'in kullanım alanları.....	24	
2.5.3.3.	Klinoptilolit'in biyomedikal alanda ve doku mühendisliğinde kullanımı.....	24	
<b>3. BÖLÜM</b>			
<b>MATERYAL ve YÖNTEMLER .....</b>			<b>27</b>
3.1.	Malzemeler .....	27	
3.2.	Sol-jel Yöntemi ile Saf Hidroksiapatit Üretimi .....	27	
3.3.	Sol-jel Yöntemi ile Klinoptilolit Katkılı Hidroksiapatit Üretimi .....	28	
3.4.	Karakterizasyon Çalışmaları .....	30	
3.4.1.	XRD analizi .....	30	
3.4.2.	TG/DTA analizi .....	30	
3.4.3.	BET analizi .....	31	
3.4.4.	SEM, S-TEM ve EDX analizi .....	31	
3.4.5.	XRF analizi .....	31	
3.4.6.	FT-IR analizi .....	31	
3.4.7.	Mekanik basma testi .....	32	
3.4.8.	Biyoyumluluk ve sitotoksisite testi .....	32	
<b>4. BÖLÜM</b>			
<b>BULGULAR.....</b>			<b>33</b>
4.1.	Sol-jel Yöntemi ile Saf ve Klinoptilolit Katkılı Hidroksiapatit Üretimi.....	33	
4.2.	Karakterizasyon Çalışmaları .....	33	
4.2.1.	Kimyasal analizler.....	33	

4.2.1.1. FT-IR analizi .....	33
4.2.1.2. XRD analizi.....	37
4.2.1.3. XRF analizi .....	40
4.2.1.4. EDX analizi .....	41
4.2.2. Morfolojik ve yapısal analizler .....	42
4.2.2.1. BET analizi.....	42
4.2.2.2. SEM ve S-TEM analizleri .....	42
4.2.3. Termal analizler .....	46
4.2.3.1 TG/DTA termal analizi .....	46
4.2.4. Mekanik basma testi.....	48
4.2.5. Biyouyumluluk ve sitotoksosite testi .....	49
5. BÖLÜM	
TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER .....	51
KAYNAKLAR .....	52
ÖZGEÇMİŞ .....	61

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Deney numuneleri ve uygulanan işlemler tablosu.....	29
Tablo 4.1.	Doğal CLP numunesine (Rota Madencilik, Gördes, Manisa) ait XRF analiz sonuçları.....	40
Tablo 4.2.	HA (1D) ve HA + %5 CLP (2D) numunelerine ait BET sonuçları tablosu.....	42



## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1. Kemik dokusunun lamella yapısı ve lamella içerisindeki kollajen molekülleri, kollajen fibrilleri ve kollajen fiberlerinin hiyerarşik yapısı (McMahon ve ark. 2013).....3
- Şekil 2.2. Kortikal ve trabeküler kemiğin gösterimi (Çakmak 2015).....4
- Şekil 2.3. Trabeküler kemik ve onu çevreleyen kortikal kemik yapısı içerisinde lamella, kanalikuli, havers kanalı ve osteonun yerleşimi (Çakmak 2015).....5
- Şekil 2.4. Mezenşimal kök hücreden osteosit oluşumu (İnsal and Pişkin 2017).....7
- Şekil 2.5. Hyalin kıkırdığın farklılaşmasıyla endokondral kemik oluşumu gösterimi (İnsal and Pişkin 2017).....7
- Şekil 2.6. Kemiğin yeniden oluşumu döngüsü (Kapinas and Delany 2011).....9
- Şekil 2.7. Hidroksiapatit kristal yapısı (Elgit 2016).....18
- Şekil 2.8. Hidroksiapatitin kimyasal yapısı (Panda ve ark. 2021).....18
- Şekil 3.1. HA Reaksiyon Düzenegi: Üç boyunlu cam reaksiyon haznesinin karıştırmalı ve sıcaklık kontrollü ceketli reaktör içerisine yerleştirilerek çözücülerin buharlaşması engellenecek şekilde üstten kondansatör ile bağlanmıştır. Yan tarafından daldırılan sıcaklık probu sayesinde sıcaklık sürekli olarak kontrol altında tutulmuştur.....28
- Şekil 3.2. Sentez Aşamaları: a. Klinoptilolit katkılı hidroksiapatit filtrasyon sonrası kremi formdadır; b. Klinoptilolit katkılı hidroksiapatit kurutma sonrası katı formdadır; c. Klinoptilolit katkılı hidroksiapatit öğütme sonrası toz formdadır.....29
- Şekil 4.1. Saf HA ve CLP numunelerine ait ATR analiz spektrumları.....34
- Şekil 4.2. 1D (saf HA), 2D (%5 CLP + HA), 3D (%10 CLP + HA), 4D (%20 CLP + HA) numunelerine ait ATR analiz spektrumları.....35



Şekil 4.3.	Farklı konsantrasyonlardaki CLP katkılı HA'nın farklı sıcaklıklarda sinterlenmesi grafiği a. Saf HA' nın 800, 950 ve 1100 °C'de sinterlenmesi, b. %5 CLP + HA'nın 800, 950 ve 1100 °C'de sinterlenmesi, c. %10 CLP + HA'nın 800, 950 ve 1100 °C'de sinterlenmesi, d. %20 CLP + HA'nın 800, 950 ve 1100 °C'de sinterlenmesi.....	36
Şekil 4.4.	Saf HA, %5 CLP + HA, %10 CLP + HA ve %20 CLP + HA numunelerinin 1100 °C'de sinterlenmesi grafiği.....	37
Şekil 4.5.	Saf HA, saf CLP ve %5 CLP + HA XRD grafiği.....	38
Şekil 4.6.	Saf HA ve %5 CLP(2D), %10 CLP(3D) ve %20 CLP(4D) katkılı HA'nın XRD grafiği.....	39
Şekil 4.7.	HA + %10 CLP numunesinin farklı sıcaklıklarda (800 °C, 950 °C ve 1100 °C) sinterlenmesi ile elde edilen numunelere ait XRD grafiklerinin karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.8.	CLP numunesinin EDX analizi.....	41
Şekil 4.9.	800 °C'de (3S-800) sinterlenmiş %10 CLP katkılı HA numunesinin EDX analizi.....	41
Şekil 4.10.	SEM analiz görüntüsü a. HA SEM analiz sonucu, b. HA + %5 CLP SEM analiz sonucu, c. HA + %10 CLP SEM analiz sonucu, d. HA + %20 CLP SEM analiz sonucu (Tüm görüntülerde ölçek çubuklarının uzunlukları 100 nm'dir.).....	43
Şekil 4.11.	Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş, saf HA(sağ taraf) ve %10 CLP katkılı HA(sol taraf) parçacıklarının SEM mikrografları: a-b. 100 °C-24 saat, c-d. 800 °C-3 saat, e-f. 950 °C-3 saat, c-d. 1100 °C-3 saat. Ölçek çubuklarının uzunlukları f ve h (300 nm) dışındaki tüm görüntülerde 100 nm'dir.....	45
Şekil 4.12.	S-TEM analiz görüntüsü a. HA(1D) S-TEM analiz sonucu, b. HA + %5 CLP(2D) S-TEM analiz sonucu c. HA + %10 CLP(3D) S-TEM analiz	

- sonucu, d. HA + %20 CLP(4D) S-TEM analiz sonucu (Tüm görüntülerde ölçek çubuklarının uzunlukları 100 nm'dir).....46
- Şekil 4.13. Saf HA, HA+%5CLP ve CLP numunelerinin TGA/DTA eğrileri.....47
- Şekil 4.14. Mekanik basma test grafiği a. Saf HA farklı sinterleme sıcaklıklarına ait basma testi grafiği, b. 2S (HA+ %5 CLP) farklı sinterleme sıcaklıkların ait basma testi grafiği, c. 3S (HA+ %10 CLP) farklı sinterleme sıcaklıkların ait basma testi grafiği, d. 4S (HA+ %20 CLP) farklı sinterleme sıcaklıkların ait basma testi grafiği.....49
- Şekil 4.15. Saf HA (1D), saf CLP (5D) ve HA+%5 CLP (2D), HA+%10 CLP (3D) ve HA+%20 CLP (4D) numunelerine ait % Hücre Canlılık Oranları ve standart sapma miktarlarını gösteren grafik. İstatistiki analiz GraphPad Prism programında 2-Way ANOVA yöntemiyle TUKEY testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ( $\alpha$ :0,005 ve 0,1234(ns), 0,0332 (\*), 0,0021 (\*\*), <0,0001 (\*\*\*\*)).....50

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

SEM	Taramalı elektron mikroskobu
S-TEM	Taramalı geçirimli elektron mikroskobu
XRD	X-ışını difraktometresi
XRF	X-ışını floresans
EDX	Enerji dağılımı x analizi
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
ATR	Azaltılmış toplam yansıma
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
TG	Termogravimetrik analiz
DTA	Diferansiyel termal analiz
ON	Osteonektin
OPN	Osteopentin
OCN	Osteokalsin
MSC	Mezenşimal kök hücre
ALP	Alkalın fosfataz
PE	Polietilen
PU	Poliüretan
PTFE	Politetrafloroetilen
PA	Poliasetat
PMMA	Polimetilmetakrilat
PET	Polietilentraftalat
SR	Silikon kauçuk
PS	Polisülfan

PLA	Polilaktik asit
PGA	Poliglikolik asit
TCP	Trikalsiyum fosfat
HA	Hidroksiapatit
CLP	Klinoptilolit
E.coli	Escherichia coli
Å	Amstrong
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
g	Gram
kV	Kilovatt
dk	Dakika
MPa	Megapaskal
M	Molar
Θ	Teta
cm <sup>-1</sup>	Dalga sayısı

# 1. BÖLÜM

## GİRİŞ

### 1.1. Amaç ve Kapsam

Kemik dokularında meydana gelen küçük çaplı hasarların bir kısmı *in-vivo* olarak rejenerasyon ile kendiliğinden iyileşirken (McMahon ve ark. 2013), büyük ölçekli hasarlarda bu durum pek mümkün değildir. Kemiğin kendini yenileyemediği durumlarda üç farklı tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Bu uygulamalar aynı hastada bir bölgeden diğerine doku nakline (otogreft), bir bireyden diğer bireye nakil (allogreft) veya hayvan dokularından alınarak nakil yapılması (xenogreft) şeklindedir. Bu tedavi tekniklerinde dezavantaj olarak enfeksiyon, doku uyumsuzluğu gibi sorunlarla karşılaşmak olası durumlardır. Allojenik ve alloplastik doku kullanılması durumunda ya kök hücreler tek tabaka halinde genişletilerek operasyon öncesinde gözenekli bir iskeleye (scaffold) yüklenir ya da hücre iskele içinde doğrudan genişleyerek donör hastaya implante edilir. Bu yöntemler için ABD’de yapılan bir araştırmaya göre 6 milyar kırktan %5-10’u doku uyumsuzluğu, metabolik bozukluklar, enfeksiyon gibi nedenlerle tedavinin yetersiz olduğu anlaşılmıştır. Böyle bir durumla karşılaşılması halinde donör bölgelerden alınan iliak krest gibi otolog kemik tedavisi tercih edilir (Logeart-Avramoglou ve ark. 2005).

Yukarıdaki tedavilerde karşılaşılan sorunların minimuma indirilebilmesi için Doku Mühendisliği oldukça önemlidir. Doku Mühendisliği hem tıp hem de mühendislik alanında bir yeni bir yaklaşımdır. Bu alanın uygulanması ve gelişmesi için biyomalzemelere ihtiyaç duyulmaktadır. Biyomalzemelerin kullanım alanına bağlı olarak spesifik özellikleri dikkate alınarak seçilmelidir (Chifiriuc ve ark. 2016). Kemik yapısına en çok benzeyen biyomalzeme seramik malzeme grubundan hidroksiapatittir. Kemik ve diş dolgu malzemesi ve implant malzemesi olarak, proteinlerin, vitaminlerin, antibiyotik ilaçların ve hormonların insan dokularına kontrollü şekilde verilmesi için ilaçlı salınım sistemlerinde, malzemelere antibakteriyel özellik kazandırmada, ortopedide gözenekli implant sistemlerinde biyoaktif kaplama malzemesi olarak, nano

boyutta üretildiğinde tümörün büyümesini engelleyici ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır (Logeart-Avramoglou ve ark. 2005). Kullanım alanının çok geniş olması nedeniyle bu çalışmada hidroksiapatitin genel özellikleri, yapısı, çeşitleri detaylı olarak incelenmiştir.

Kemik dokusunun temel inorganik bileşeni olan hidroksiapatitin (HA), yüksek biyouyumluluğu ve uygun biyomimetik yapısı sayesinde kemik doku onarımında skafold ve dolgu malzemesi olarak yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir. Ancak saf HA'nın yüksek stabilitesi nedeniyle vücutta çözünürlüğünün düşük olması dokuların iyileşme sürecini uzatmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda hidroksiapatiti farklı biyomimetik iyon katkılarıyla ya da minerallerle zenginleştirme yönünde çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Biyomimetik iyon veya doğal alümina silikat gibi katkılar hidroksiapatitin mekanik dayanımını, kristalleşme oranını, çözünme hızını, dokulara bağlanma özelliğini ve biyoaktivitesini artırır. Termal özelliklerini iyileştirir ve antibakteriyel özellik kazandırır.

Bu çalışmada, doğal cam bileşiminde yüksek porozite ve yüksek yüzey alanına sahip olan ve en biyouyumlu zeolit minerallerinden olduğu bildirilen klinoptilit (CLP) mineralinin hidroksiapatit ile kimyasal sentez sırasında homojen olarak birleştirilerek nano boyutta üretimi ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Klinoptilit mineralinin %5, %10 ve %20 oranlarında saf HA'ya katkı olarak stokiyometrik HA'nın sol-jel yöntemiyle üretimi sırasında eklendiği bileşimler bilginiz dahilinde literatürde ilk kez araştırılmıştır. Saf ve çeşitli oranlardaki CLP katkılı HA'nın sentezi ve farklı sıcaklıklarda (800°C, 950°C ve 1100°C) sinterlenmesi ile üretilen nano tozlar araştırılarak karşılaştırmalı olarak karakterize edilmiştir.

## 2. BÖLÜM

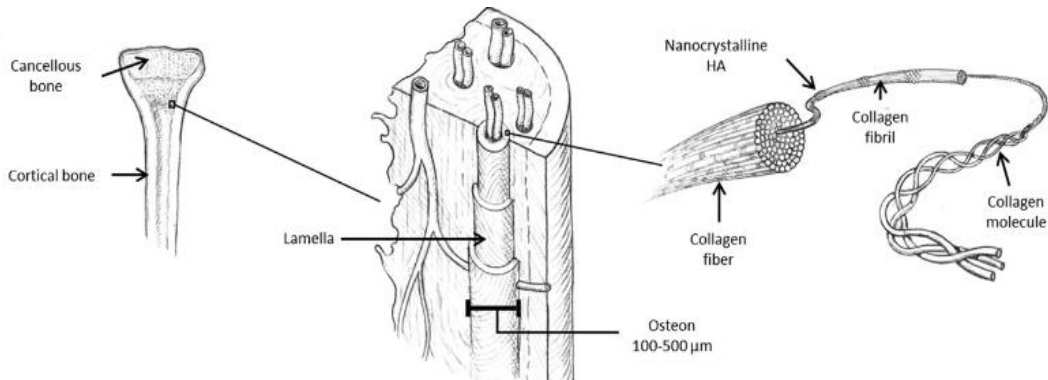
### GENEL BİLGİLER

#### 2.1. Kemiğin Yapısı ve Özellikleri

Kemik, organik kısmı çoğunlukla kollajenden ve inorganik kısmı hidroksiapatitten oluşan nanokompozit bir yapıdır (McMahon ve ark. 2013). Vücuda mekanik destek sağlamak, fizyo-kimyasal ve mekanik-kimyasal sinyalleri iletme görevlerinin olması nedeniyle iskelet yapısı için kemik çok önemlidir. Bütün kemik dokularının görevi bölgeye göre farklılık gösterse de vücuttaki en önemli görevi mekanik dayanım sağlamaktır (Logeart-Avramoglou ve ark. 2005).

##### 2.1.1. Kemiğin fizyolojik ve kimyasal yapısı

Kemik organik fazının tamamına yakın kısmını oluşturan ve osteoblastlar tarafından sentezlenen tip 1 kollajen doğrusal protein molekülüdür. Kollajen lifleri birleşerek kollajen fibrillerini, kollajen fibrilleri birleşerek kollajen fiberlerini, kollajen fiberleri birleşerek ise kemik lamellasını oluşturur (Şekil 2.1.). Kemiğin çok az bir organik kısmını ise kemik indükleyici proteinler (osteonektin (ON), osteopontin (OPN), osteokalsin (OCN)), büyüme faktörleri, gibi non-kollajen proteinler oluşturmaktadır. Bu proteinlerin amacı, kemik hücrelerinin fonksiyonlarını yönetmektir (Çakmak 2015).

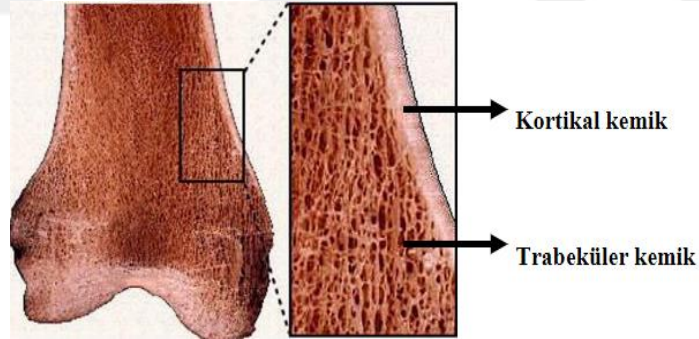


Şekil 2.1. Kemik dokusunun lamella yapısı ve lamella içerisindeki kollajen molekülleri, kollajen fibrilleri ve kollajen fiberlerinin hiyerarşik yapısı (McMahon ve ark. 2013).

Kemiğin inorganik kısmını, kimyasal formülü  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  olan ve yapısında az bir

miktarda karbonat, sodyum, magnezyum, potasyum gibi pek çok iyonu da barındıran hidroksiapatit minerali oluşturur. Hidroksiapatitin birim hücre yapısı hegzagonaldır ve hidroksiapatit kristalleri hücre içerisinde ne kadar düzenli yerleşmiş ise kemik sağlamlığı o kadar fazla demektir (Çakmak 2015).

Kemik, omurgalı canlıların iskelet sisteminin oluşmasının en temel bileşenidir ve kendini yenileyebilir özelliğe sahiptir. Vücut ağırlığının yaklaşık 5'te birini kemik oluşturur. Kemik bileşenlerinden organik matrisi büyük oranda proteinlerden oluşurken, tuzlardan oluşan inorganik yapı ise organik matris içerisinde dağılmıştır. İnsan femur matrisi içeriği; %70 inorganik tuzlar, %20 organik faz ve %10 su şeklindedir. Kemik vücuttaki temel görevleri; iç organları koruma, vücuda hareket yeteneği kazandırma, kan hücresi üretme, kalsiyum ve fosfor gibi mineralleri depolama, kanın asitlik ve baziklik dengesini korumaktır. Yapısına göre kemik çeşitleri iki tanedir. Bunlar; kortikal (sıkı) ve trabeküler (süngerimsi) kemiklerdir. Kortikal ve trabeküler kemik yapısı Şekil 2.2.'de verilmiştir. Toplam kemik ağırlığının %80'ini kortikal kemik, %20'sini ise trabeküler kemik oluşturur (Çakmak 2015).



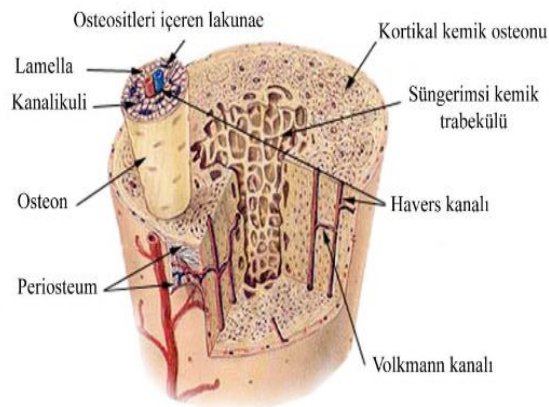
Şekil 2.2. Kortikal ve trabeküler kemiğin gösterimi (Çakmak 2015).

Kortikal kemik sıkı bir düzen içerisindedir. Yani çok az boşluklu bir yapıya sahiptir ve bu özelliği nedeniyle trabeküler kemiğin etrafında kabuk görevi görür. Ayrıca uzun kemiklerin shaft kısmında bulunur. Trabeküler kemik ise boşluklu bir yapıya sahiptir ve bahsi geçen boşluklar kemik iliği ile doludur. Vücutta uzun kemiklerin uç kısımlarında ve bel omurlarında görülür. Femur, tibia gibi uzun kemiklerin uç kısımlarında kalan ve kemiğin oluşumunda rol oynayan bölgeye epifiz adı verilir. Epifizin dışı kortikal kemikle sarılı olup içi trabeküler kemikten oluşur. Epifiz kısımların arasında kalan ve kortikal kemikten oluşan bölgeye ise diyafiz denir, bu kısmın ortasında ise kemik iliği



bulunur (Çakmak 2015). Kemik yapısında içten dışa doğru kemik iliği, onu saran süngerimsi kemik ve en dışta eklem kıkırdağı bulunmaktadır. Kemiğin dış yüzeyinde, pürüzlü, sağlam, çıkıntılı şekilde bağlanma noktaları vardır. Bu bağlar kaslara tutunma ve eklem oluşturma noktasıdır (Tüfekçi 2008). Şekline göre kemik çeşitleri dört tanedir. Bunlar; uzun kemik, kısa kemik, yassı kemik ve düzensiz kemiktir. Kol ve bacak kemikleri uzun kemik, el ve ayak parmakları kısa kemik, kafatası ise yassı kemik örneğidir (Çakmak 2015).

Kemiğin düzenli ve lamellar kemik olmak üzere iki çeşit mikro yapısı bulunmaktadır. Düzenli kemiğin yapısı mekanik dayanımı arttıran kalın kollajen fiberlerden oluşur ve bu fiberler rastgele dizilmiştir. Kişinin yaşı büyüdükçe düzenli kemiğin yerini lamellar kemik alır. Lamellar kemikte bulunan kollajen fiberler birbirine paralel olarak dizilmiştir ve bu kemiğin gösterdiği mekanik özellikler homojen değildir. Bu durumda mekanik dayanım maksimumdur. Yani lamellar kemik, düzenli kemiğe göre daha fazla mineralleşmiş matris içerir. Sert kemiğin esas yapısını oluşturan, merkezi bir kanal etrafında kollajen fiberlerin diziliş yönüne bağlı olarak iç içe halkalar şeklinde düzenlenmiş, birbirlerine paralel ince kanallarla bağlanmış halkalar sistemine osteon denir (Şekil 2.3.). Osteonların merkezinde, uzun kemik kanalı olarak da isimlendirilen ‘Havers Kanalı’ bulunur. Havers kanalının çevresi lamella ile sarılıdır. Lamella içerisinde lakuna adı verilen kemik hücreleri bulunur. Kanalikuli ise lakuna ve havers kanalları arasındaki bağlantıyı sağlar (Çakmak 2015).



Şekil 2.3. Trabeküler kemik ve onu çevreleyen kortikal kemik yapısı içerisinde lamella, kanalikuli, havers kanalı ve osteonun yerleşimi (Çakmak 2015).

### **2.1.2. Kemiğin biyomekaniğine etki eden faktörler**

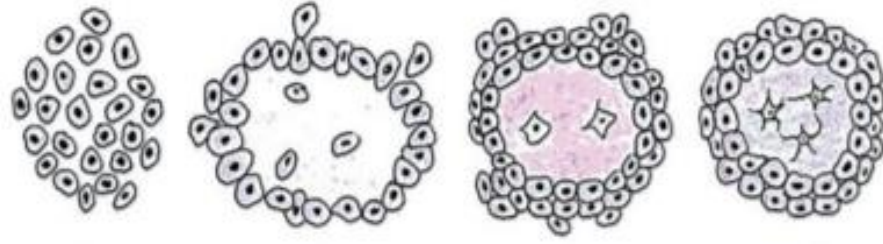
Biyomekanik kuvvetler, kemiğin şekil veya eksen değiştirmesine neden olur (Katsimbri 2017). Herhangi bir yapının hareket etmesini ya da şekil değiştirmesini sağlayan kuvvet ikiye ayrılır, bunlar statik kuvvet ve mekanik kuvvettir. Statik kuvvette cisimlere etki eden kuvvet toplamı ve moment toplamı sıfırdır. Bu sebeple tekrarlayan çalışmalar için statik kuvvet incelenemez. Cisim üzerindeki tekrarlayan kuvvetlerin etkisini incelemek için dinamik kuvvet incelenmelidir. Kemiğin en önemli görevi yük taşımaktır. Yük taşıma kapasitesi; kemiğin geometrisine (şekil, boyut vs.), materyal özelliklerine (doku özellikleri) ve uygulanan yüke (yönü ve büyüklüğüne) bağlıdır. Fonksiyonel olarak en önemli mekanik özellikleri: kırılma kuvveti, sertlik ve dayanıklılıktır. Kemik biyomekaniğinde asıl önemli olan ve incelenen nokta kemiğin kırılabilirlik (fragility) özelliğidir. Biyomekanik testlerle kemiğin nasıl kırılabildiği, kırılmanın kolaylaşma nedeni, uygulanması gereken tedavi yöntemi gibi konulara açıklık getirilir (Kilimci ve Kara 2017).

### **2.1.3. Yeni kemik oluşumu (Ossifikasyon)**

Ossifikasyonun genel karşılığı kemikleşmedir. Normal kemik oluşumuna ve hastalığa bağlı olarak istenmeyen kemik oluşumuna atfen aynı kelime kullanılır. Kıkırdak dokudaki yapının mineralleşmesi ile birlikte sertleşmesi ve şekillenmesi ile de gerçekleşen ossifikasyon iki çeşittir.

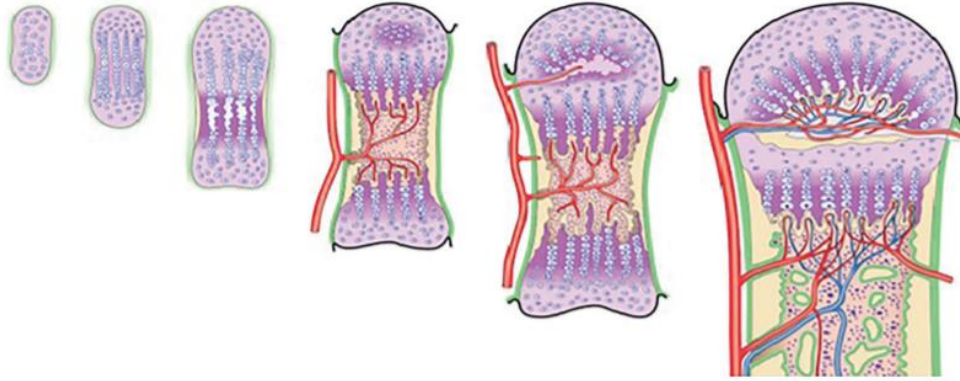
#### **2.1.3.1. Ossifikasyon çeşitleri**

Endokondral ve intramembranöz olmak üzere iki çeşit ossifikasyon vardır. İnamembranöz ossifikasyon, intramembranöz kemik oluşumu için farklılaşan doku fibröz membrandır. Bu yöntem, vücuttaki yassı ve kısa kemiklerin oluşumu için çok önemlidir. Madibula, klavikula, kafatası, köprücük kemiği gibi dokular bu şekilde oluşur. Bu yöntemin aşamaları şu şekildedir: Mezenşimal hücreler damarın etrafını çevreler ve bu kümelenme ile ossifikasyon merkezi oluşur. Bu yapı farklılaşarak osteoblasta dönüşür (Şekil 2.4). Bu durumdayken süngerimsi yapıdadır ve lamella içermez. Osteoblast, osteosit salgılayarak periosteum oluşmasını sağlar. Bu yapı şekillenerek kemik oluşmasına sebep olur (İnsal ve Pişkin 2017).



Şekil 2.4. Mezenşimal kök hücreden osteosit oluşumu (İnsal ve Pişkin 2017).

Endokondral kemik oluşumu, vaküer bir yapı olan hyalin kıkırdağın farklılaşarak kemik haline gelmesi olayıdır ve omurgalı sistemlerde boyuna kemik büyümesi olarak da anlandırılmaktadır (Gerber ve ark. 1999). Vücuttaki uzun kemikler bu şekilde meydana gelmektedir (Şekil 2.5.). Hyalin kıkırdak, süngerimsi kemiğe dönüşürken oluşan boşluklar kan damarlarıyla dolar. Bu esnada osteoblast, osteosit salgılar ve salgılanan osteosit hyalin kıkırdaktaki diyafiz etrafında kemik halkası oluşturur. Kıkırdağın yapısı bozulur ve etrafında yoğun ve düzensiz periosteum oluşur. Şekillenerek kemik oluşumuna sebep olur. Heteroplastik kemik oluşumu ise patolojik bir oluşum türüdür. İskelet sistemi dışında yani başka dokuda oluşum gerçekleşir (İnsal ve Pişkin 2017).



Şekil 2.5. Hyalin kıkırdağın farklılaşmasıyla endokondral kemik oluşumu gösterimi (İnsal ve Pişkin 2017).

### 2.1.3.2. Kemik yapısını oluşturan hücreler

Kemik yapısını oluşturan hücreler osteoblast, osteoklast ve osteosit olmak üzere üç tanedir. Osteoblast, mezenkimal kök hücrelerden (MSC) farklılaşarak oluşur ve kemiklerin oluşumunda ve yenilenmesinde görev alır. Asıl görevi, osteoidlerin organik

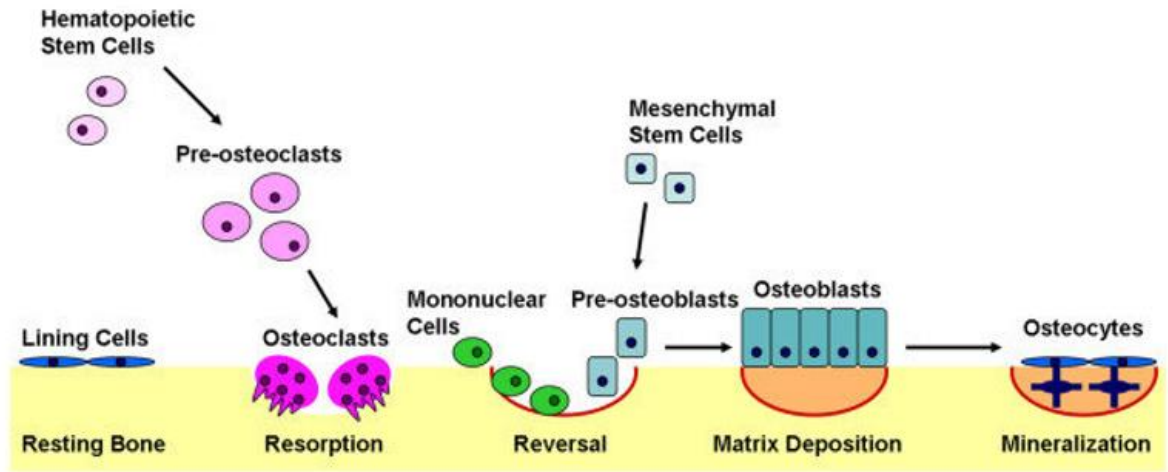
ve inorganik fazlarının üretilmesidir. Kemik matrisinin birikimi ve osteoklast aktivitesinin düzenlenmesi, tip I kollajen, OPN, OCN, BSP gibi proteinleri ve alkalın fosfataz (ALP) gibi enzimleri sentezleme görevleri de vardır. Doku matriksinde kalsiyum tuzlarının birikmesiyle ossifikasyonu yönetirler. Ossifikasyon, osteoblastlar tarafından salgılanan osteoid doku matriksinde kalsiyum, fosfor ve diğerk mineral maddelerin birikmesiyle gerçek kemik oluşumuna verilen addır. Kalsifikasyon ise kalsiyum tuzlarının birikimi olarak tanımlanır. Osteosit, lamellada lakuna adı verilen kemik hücrelerinin içerisinde bulunur ve insülin benzeri büyüme faktörü ve doku büyüme faktörü  $\beta$  gibi büyüme faktörlerini sentezleyerek kemik oluşumunda görev alır. Olgunlaşmamış haldeki kalsiyum sentezleyemeyen osteoblastların olgunlaşmış ve kalsiyum sentezleyebilir hale farklılaşmasını sağlar ve bu olay neticesinde oluşur. Sıkı ve süngerimsi olmak üzere iki farklı şekilde bulunabilir. Kemik hücreleri içerisinde dinlenme hücresi olarak da adlandırılabilir. En önemli görevi ise kemiğin canlı kalmasını sağlamaktır. Osteoklast, kaynağı hematopoietik kök hücrelerdir ve farklı asitleri ve proteolitik enzimleri sentezleyerek kimyasal etkiyle kemik hücrelerinin yıkımı görevini üstlenir. Hücre yıkımı, olumsuz bir durum gibi algılansa da hücre ve doku yenilenmesi için gerekli ve oldukça önemli bir prosestir (Çakmak 2015).

### **2.1.3.3. Kemiğin yeniden oluşması (Remodeling)**

Kemiğin şekillenmesi, yaşam boyu fizyolojik etkilere ve biyomekanik kuvvetlere karşı gösterdiği tepkidir. Bu durum modellenme ya da şekillenme olarak adlandırılır. Erişkinlikten önceki dönemde vücuttaki yapım faaliyetlerinin yıkım faaliyetlerinden daha fazla olması nedeniyle epifiz plaklarda boyuna büyüme gerçekleşir. Kemik büyümesi erişkinlik döneminde başlayıp hayat boyu devam eden bir süreçtir (İnsal ve Pişkin 2017).

Kemik, sürekli olarak yeniden şekillenen bir dokudur (İnsal ve Pişkin 2017). Kemiğin biyomekanik işlevlerini sürdürebilmesi ve sahip olduğu mineral dengesinin korunması için bu yenilenme şarttır (Koçak 2021). Yeniden şekillenme (remodeling) osteoblastların ve osteoklastların vücuda etkisinden ve işlevsel olarak birbiriyle uyumlu çalışmasından kaynaklanır. Yeniden şekillenme sayesinde vücuttaki mikro seviyedeki kırıklar kendiliğinden iyileşir (İnsal ve Pişkin 2017). Kemik üretimi birincil ve ikincil ossifikasyon sonucu oluşur. Birincil ossifikasyon, fibril kümelerinin meydana getirdiği

kıkırdak bölgelerde hızlı minerilizasyon nedeniyle kolajenin katmanlı ve düzenli bir yapı oluşturmadığı ve hidroksiapatit ile bağlantısının zayıf olduğu düzensiz bir mikro yapı elde edilmesiyle gerçekleşir. Düzensiz şekildeki kemiklerin yeniden düzenli hale gelmesiyle ikincil kemik oluşumu gerçekleşir (Koçak 2021). İlk olarak kemik tarafından hormon ya da mekanik değişikliklerden kaynaklanan değişimlerin sinyal tespiti yapılır. Daha sonra osteosit hücreleri geri çekilerek osteoklastlar aktive edilir. Osteoklastlar polarizasyon ile büyük bir osteoklast popülasyonuna dönüşerek kemik dokularına yapışırlar ve bazı enzimler ve hidrojen iyonları salgılayarak kemik minerali ve organik fazları parçalamak için pH'ı düşürürler. Emilimin tamamlanması için osteoklastların yok olması gerekir ve bu süreç 2-4 hafta sürer. Bu durumda monositler, osteositler ve pre-osteoblastlar sinyal faktörlerinin yardımıyla yeni kemik oluşumunun temelini oluşturur. Yeniden şekillenme döngüsü birbirini izleyen aktivasyon, rezorpsiyon, tersine çevirme, oluşum ve sonlandırma aşamalarından oluşur (Şekil 2.6.). Yeni kemikler osteoblast hücreleri tarafından üretilir. Doğal kemik yeniden şekillenmesi konusu, aktif maddeler kullanarak kemik dokularının onarımı ve yenilenmesi için doku mühendisliği stratejilerinin geliştirilmesine de katkıda bulunmuştur (Katsimbri 2017).



Şekil 2.6. Kemik yeniden oluşumu döngüsü (Kapinas ve Delany 2011).

## **2.2. Doku Mühendisliği**

Doku mühendisliği, insan dokusunun (organ, kemik, kıkırdak, yapay doku vs.) yeniden yapılandırılmasına ve yenilenmesine yönelik gerekli olan strateji ve bilgi birikimini kullanarak çözüm üretmeye odaklanan bilim dalıdır (Chifiriuc ve ark. 2016).

### **2.2.1. Doku mühendisliğinin tanımı ve uygulama alanları**

Hastalık, yaralanma ve travma gibi durumlar, insan vücudundaki dokuların hasar görmesine ve dejenerasyonuna yol açabilir. Bu durum onarım, değiştirme veya yenilenmesini kolaylaştıracak tedavileri gerektirir. Tedavi, aynı hastada bir bölgeden diğerine doku nakline (otogreft), bir bireyden diğer bireye nakil (allogreft) veya hayvan dokusundan nakil (xenogreft) şeklinde yapılır. Bu tedavi tekniklerinde enfeksiyon, doku uyumsuzluğı gibi sorunlarla karşılaşılabılır. Bu sorunlardan bazıları şöyledir: Otogreftlerin elde edilmesi pahalıdır, ağırlıdır, anatomik sınırlamalar içerir. Benzer şekilde, allogreftler ve transplantlar, hastalar için yeterli dokuya erişim sorunları ve hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilme riskleri ve donörden enfeksiyon veya hastalık bulaştırma olasılığı nedeniyle ciddi kısıtlamalara sahiptir (Logeart-Avramoglou ve ark 2005; O'Brien 2011). Doku mühendisliğindeki amaç, uzun zamandır kabul görmüş olan organ nakli ile tedavi yerine vücuda olası yan etkilerinin daha az olduğu biyouyumlu olan, hasarlı dokular yerine veya destekleyici alternatif biyomalzemeler tasarlayarak geliştirmektir. Doku mühendisliği üzerine çalışmalar yapmak ve bu konuda verim alabilmek için hücreler, büyüme faktörleri ve hücresele çoğalmayı, farklılaşmayı ve yeni dokunun entegrasyonunu uyaran diğer biyoaktif moleküller için iskele ve/veya dağıtım sistemleri olarak biyomalzemelerin kullanılması gerekir (Chifiriuc ve ark 2016).

### **2.2.2. Osteoindüksiyon, osteokondüksiyon, osteointegrasyon**

Osteoindüksiyon: Olgunlaşmamış hücrelerin toplanarak preostablastlara dönüşmesine verilen addır. Osteoindüksiyon, kemik iyileşmesi esnasında düzenli olarak görülür (Albrektsson ve Johansson 2001). Osteoindüktif malzemeler, yeni kemik oluşumunu destekleyen maddelerdir (Koçak 2021).

Osteokondüksiyon: Kemiğin herhangi bir yüzeyde büyümesi olarak tanımlanır ve gözeneklere veya kanallara doğru kemik büyümesine izin veren yüzeylere osteokondüktif yüzey denir. Osteokondüksiyon, kemik implantlarında sıklıkla görülür. Burada kullanılacak olan malzemenin biyouyumluluğu yüksek olmalıdır. Ayrıca kemik büyümesinin farklılaşmış hücrelerin etkisine bağlı olması nedeniyle osteoindüksiyon aşaması osteokondüksiyon aşamasını da etkiler (Albrektsson ve Johansson 2001).

Osteointegrasyon: Canlı kemik doku ile malzeme yüzeyi arasındaki direkt bağlantıdır. Yani arada fibröz doku bulunmamaktadır. Bu aşamadaki en önemli parametre, implantın yüzey özellikleridir (Koçak 2021).

### **2.3. Biyomalzemeler**

Detaylı bilgi bölüm 2.3.1’de verilmiştir.

#### **2.3.1. Biyomalzemelerin tanımı**

Biyomalzemeler, hasarlı doku veya organların tedavisinde kullanılan ya da onların yerine geçebilen (implant), vücut sıvılarıyla sürekli veya aralıklı olarak temas halinde olan malzemelerdir. Biyomalzeme alanı malzeme, biyoloji ve mühendislik bilimi kavram ve teknikleri ile vücuttaki doğal yapıları ve fonksiyonları doğru bir şekilde modellemek için biyoaktif ve biyomimitik malzemelerin sentezi ve tasarımı üzerine çalışmaları kapsamaktadır. Biyomalzemelerin diğer bir tanımı ise hasarlı veya hastalıklı dokunun yerini alarak ve yeniden büyümesini kolaylaştırmayı amaçlayan biyomateryallerdir (Liu ve ark. 2022). Örnek verilecek olursa dental uygulama için kullanılan bir biyomalzemenin uygulamadaki esas görevi, daha fazla kök gelişimini teşvik etmek ve hem kök kalınlığını hem de uzunluğunu arttırmak için kalsifiye dokunun birikmesiyle sürekli olarak yeni dentin doku oluşumuna sebep olmaktır. Bu sayede diş, kırılmaya karşı güçlenmiş ve stabilitesi artmış olacaktır (Raddall ve ark 2019).

#### **2.3.2. Biyomalzemelerin özellikleri**

Biyomalzemenin kullanım alanının çok fazla olması sebebiyle kullanılan malzemenin çeşidi de bir o kadar fazladır. Seçilen malzeme, doku tipine uygun olmalıdır. Örneğin kalça ya da diz implantı olarak kullanılacak malzemenin dayanımı yüksek, kırılma eğilimi

az olmalıdır. Fakat biyomalzeme olarak tanımladığımız her malzemenin sahip olması gereken, doku türünden bağımsız bazı özellikleri vardır ve bu özelliklere sahip olmak zorundalardır. Bu genel özellikler şu şekildedir:

**Biyouyumluluk:** Herhangi bir malzemenin vücut ile temasıyla birlikte vücuttaki kimyasal yapıyı bozmaması ve ondan etkilenmemesi, fiziksel ve biyolojik olarak uyum sağlayarak iltihaplanma gibi istenmeyen tepkimelere neden olmaması ve oluşan bir tepkiye karşı uygun cevap verebilmesi için bir malzemenin sahip olması gereken en önemli özelliktir (O'Brien 2011; Güven 2014).

**Biyolojik olarak parçalanabilirlik:** Vücut içerisine yerleştirilen implantların kendi hücre dışı matrislerini oluşturarak implantın vücut tarafından geçici olarak kabul edilmesi için malzemede olması gereken, her malzeme için spesifik bir özelliktir (O'Brien 2011; Edgar ve ark 2016).

**Korozyon Direnci:** Vücutta bulunan sulu ortam, anyonik ve katyonik iyonlar, proteinlerce zengin ortam koşulları gibi malzemenin aşınmasını kolaylaştıran nedenlere karşı gösterdiği dirençtir. Biyomalzeme sınıfları arasında korozyon direnci en düşük olan malzeme metallerdir ve bu direnci arttırmak için malzeme oksit tabakasıyla kaplanır (Akça 2016).

**Mekanik Özellikler:** Kullanılacak olan malzemenin, implante edileceği doku ile arasındaki uyumsuzluk nedeniyle oluşabilecek herhangi bir kalıcı ya da geçici hasarı önlemek için mekanik özelliklerinin benzer olmasıdır (O'Brien 2011; Akça 2016).

**Uygun Tasarım:** Biyomalzemenin, uygulanacağı dokuya özgü olarak uyum geometrik şekil ve yapıda tasarlanmasıdır. Aksi takdirde kalıcı veya geçici hasara neden olabilir (Demirkol 2013).

### **2.3.3. Biyomalzemelerin kullanım alanları**

Biyomalzemeler temelde yumuşak doku ve sert doku yerine geçecek malzemeler olarak iki farklı uygulama alanına sahiptir ve iskelet sisteminden kalp damar sistemine, organlardan kontak lenslere kadar birçok alanda kendilerini gösterirler. *In-vivo* implantlar, diş dolgu malzemeleri, kalp kapakçıkları, yapay organlar, işitme cihazları gibi teşhis ve tedavide kullanılan bütün cihazların temelinde biyomalzemeler vardır.



Kullanım alanı ve malzeme çeşidi çok fazla olduğu için buradaki en önemli husus kullanılacak olan malzemenin kullanım amacına ve yerine göre en uygun şekilde seçilmesidir (Özkan ve ark 2016).

#### **2.3.4. Biyomalzemelerin sınıflandırılması**

Kemik Doku Mühendisliği'nde kullanılan biyomalzemeler: metaller, seramikler, polimerler ve bunların kompozitlerini kapsamaktadır (Koçak 2021).

##### **2.3.4.1. Metalik biyomalzemeler**

Metaller, en yaygın kullanılan ve asıl görevi yük taşımak olan implantlarda kullanılan malzemedir. Vücutta, kalça, diz, omuz, ayak bileği vb. için kırık sabitleme plakaları ve tüm eklem protezleri (yapay eklemler) gibi yerlerde kullanılır. Buna ek olarak metal implantlar maksillofasiyal cerrahide, kardiyovasküler cerrahide ve diş materyali olarak kullanılma gibi birçok alanda kendisini göstermektedir. Çünkü metal malzemelerin termal ve elektriksel iletkenliği, mekanik özellikleri mükemmel yakındır. Bu olumlu özelliklerine karşılık korozyon direncinin düşük olması, kemik yapısına göre sertliğinin fazla olması gibi olumsuz özellikleri de vardır. Metalik malzemelerin olumsuz özelliği biyoinert olmasıdır ki bu özelliği nedeniyle doku ile malzeme arasında bağlantı kurulamaz. Malzeme sadece kemik yüzeyindeki pürüzlü dokuya tutunabilir. Bu durum da uzun periyotta çeşitli komplikasyonların oluşmasına neden olabilir. Tıbbi cihaz uygulamaları için birçok metal ve alaşım kullanılmasına rağmen, en yaygın olarak kullanılan malzemeler paslanmaz çelikler, ticari olarak saf titanyum ve titanyum alaşımları, altın, dental amalgam ve kobalt bazlı alaşımlardır (Davis 2003; Pasinli 2004; Demirkol 2013).

##### **2.3.4.2. Polimerik biyomalzemeler**

Biyopolimerler, yaşayan organizmalar tarafından oluşturulan, doğal biyobozunabilir malzemelerdir. Biyokütleden ve doğal modifiye organizmalardan (mikrobiyal poliesterler, biyomonomer poliesterler, bakteriyel selüloz gibi) sentezlenirler. Canlıların sentezleyebileceği birçok tipte polimer vardır ki kimyasal yapılarına göre polimerler; polyesterler, proteinler, karbonhidratlar, yağ ve yağ asitleri, polifenoller ve özel polimerler olmak üzere altı gruba ayrılır (Çankaya ve Sökmen 2017). Biyomedikal alanda kullanılan polimerler Polietilen (PE), poliüretan (PU), politetrafloroetilen

(PTFE), poliasetal (PA), polimetilmetakrilat (PMMA), polietilenteraftalat (PET), silikon kauçuk (SR), polisülfon (PS), polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asit (PGA)'tir. Mekanik dayanımının zayıf olması gibi dezavantajları olsa da çok çeşitli bileşenlerde ve şekillerde hazırlanabilmeleri nedeniyle sıklıkla tercih edilirler (Pasinli 2004).

#### **2.3.4.3. Seramik biyomalzemeler**

Seramikler biyomalzeme sınıflarından biridir ve biyomalzemelerin genel özelliklerine (biyoyumluluk, biyoinertlik vs) sahiptir. Vücutta hem implant malzemesi olarak hem de kemik yerine geçebilen biyomalzeme olarak kullanılabilir olması biyoseramiklerin uygulama alanlarını genişletmektedir (Demirkol 2013).

Seramiklerin biyomalzeme olarak kullanılmasının temel nedeni Ca, K, Na gibi iyonları içermesidir. Biyoseramikler; biyoaktif, biyoinert ve biyobozunur olmak üzere üç sınıfta incelenirler (Hench 1991). Biyoinert malzemelere alümina ve zirkonya örnek verilebilir. Bu malzemelerde doku ve implant arasındaki etkileşim yok denecek kadar azdır ve bu özellik seramiklerin vücut içerisinde kullanım için tercih edilmesinde önemli bir özelliktir. Biyoaktif malzemeler ise kendisini çevreleyen doku ile doğrudan bağlantı kurarak dokunun biyomalzeme içerisinde büyümesini sağlar. Bu durum osteointegrasyon olarak tanımlanır ve biyoaktif seramiklerin tercih edilmesinin en önemli nedeni bu özelliktir. Biyoaktif malzemelere örnek olarak hidroksiapatit, biyocam ve cam seramikler verilebilir. Biyobozunur seramikler biyolojik olarak bozunarak doku ile yer değiştirir. Örnek verilecek olursa, kemikte kırık oluştuğunda kullanılan implant ile doku arasında biyoaktif yüzey oluşur ve bu yüzey zamanla değişerek implantın çözünmesine ve implantın yerine dokunun geçmesine olanak sağlar. Burada dikkat edilmesi gereken husus, ara yüzey kararlılığı ve dayanımının korunmasıdır. Diğer bir husus ise emilim hızı ile yeniden oluşma hızının birbiriyle uyumlu olmasıdır. Biyobozunur malzemeye örnek olarak tri-kalsiyum fosfat verilebilir (Demirkol 2013).

Seramiklerin en sık kullanım alanı, içeriğindeki porselen malzemelerin doğal diş yapısına çok benzer olması nedeniyle dental uygulamalardır (Kırkık ve ark 2019). Bunun yanında seramikler metal biyomalzemeler gibi kalça diz ve eklem implantı olarak da kullanılabilir. (Koçak 2021).

Alümina, yaygın olarak kullanılan seramik bir biyomalzemedir. Kırılma tokluğunun orta düzeyde olması, biyoyumluluğunun yüksek olması, korozyon direncinin yüksek olması, kimyasal ve termal kararlılığı, elektriksel yalıtım özellikleri nedeniyle kalça protezi ve diş implantlarında sıklıkla tercih edilmektedir (Auerkari 1996; De Aza ve ark. 2002). Alfa- $Al_2O_3$  'ün, 1600-1700°C sıcaklıkta sinterlenmesiyle sentezlenir (Pasinli 2004).

Zirkonya, mekanik özellikleri metallere çok benzeyen bir seramik biyomalzemedir. Buna bağlı olarak kalça protezlerinde kullanım için tercih edilmektedir. Yapılan *in-vivo* çalışmalarda zirkonyanın kemik ve kas dokusuna herhangi bir zarar vermediği ve biyoyumlu özelliğe sahip olduğu anlaşılmıştır (Manicone ve ark. 2007).

Trikalsiyum fosfat, düşük mekanik özelliklere sahip bir seramik malzemedir. Bu dezavantajı nedeniyle yük taşıması gereken implantlar için kullanılamaz. Çözünme hızlı ise çok yüksektir ve bu avantajı nedeniyle de kemik ile yer değiştirebilen biyoemilebilir implant olarak sıklıkla tercih edilen bir malzemedir. Trikalsiyum fosfatın biyomalzemelerde kullanılan fazları  $\alpha$ - ve  $\beta$ - TCP fazlarıdır ve  $\beta$ - TCP fazı 1120-1290°C aralıklarında  $\alpha$ - TCP fazına dönüşmektedir. Ca/P'ın trikalsiyum fosfat için oranı 1.5'tir. TCP ortopedik ve dental tedavilerde ve ilaç salınımı uygulamalarında tercih edilmektedir (Detsch ve ark. 2008; Akça 2016).

Cam ve cam seramiğin kullanıldığı implantlarda doku ile implant arasında kuvvetli bir bağ oluşmaktadır. Buna bağlı olarak kemik büyümesini teşvik eden iyi biyoaktiviteye ve hücre tutunmasına sahiptir. Omurga ve kemik dolgusu olarak kullanılabilirler (Hench 1991).

Magnezyum; kemik, protein, asit yapımında, B vitamini aktivasyonunda, kasların gevşeme hareketinde, kanın pıhtılaşmasında, adenozin trifosfat üretiminde, insülin salgılanmasında rol oynaması nedeniyle insan vücudu için çok önemli bir elementtir. Magnezyumun % 60'ı kemiklerde, geri kalan kısmı ise doku ve organları oluşturan hücrelerin içinde bulunmaktadır. Kemik için rolü ise, kemiğin kırılma direncini belirliyor olmasıdır. Magnezyum oranının düşmesi kemiğin kırılma direnci azalmakta olduğunu gösterir (Akça 2016).

Hidroksiapatit (HA), biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanılan biyoseramik türüdür. Bölüm 2.4'te ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

## **2.4. Hidroksiapatit**

Olgunlaşmış herhangi bir kemik ağırlığının yaklaşık %35'i organik, geri kalanı ise inorganik kalsiyum fosfat sistemi, yani hidroksiapatittir (Roohani, Cheong and Wang, 2021). Hidroksiapatit, kimyasal formülü  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  veya  $Ca_5(PO_4)_3(OH)$  olan ve kalsiyum fosfat temelli, yapay kemik greftleri için en yaygın kullanılan biyoseramiktir. Başka bir deyişle apatitler olarak bilinen fosfat minerallerinin hidroksillenmiş temsilcisi olarak da tanımlanabilir. Kimyasal bileşimi doğal kemik yapısına çok benzer olması nedeniyle biyomedikal alanda çok sık kullanılan bir malzemedir (Sopyan ve ark. 2007; Granito ve ark. 2018; Panda ve ark. 2021).

### **2.4.1. Hidroksiapatit'in genel özellikleri**

Hidroksiapatit bir çeşit kalsiyum fosfat türüdür ve biyouyumluluk, biyoaktivite ve osteoiletkenlik gibi üstün biyolojik özelliklere sahiptir (Faksawat ve ark. 2021). Sahip olduğu Ca ve P elementleri kemiğin yapısında da bulunduğu için dokunun malzemeye vereceği tepki yok denecek kadar azdır ki bu da malzemenin biyouyumluluğunun çok yüksek olduğunu gösterir (Evis 2011). Hidroksiapatitin kemik dokusu yerine kullanılabilmesi için sahip olması gereken başka özellikler de vardır. Bunlar; biyobozunurluk, biyoabsorbe edilebilirlik ve biyoaktivite, uygun gözenekli yapı, sahip olduğu ve özelliklerini iyileştiren biyomimetik bileşenlerdir. En önemli özelliği osteoiletkenlik, yani kemik oluşumuna izin verme özelliğidir. Bu özellik HA'nın kemik yerine kullanılmasındaki en büyük etkidir. Fakat doğal kemiğin yapısında bulunan apatitin HA'dan bazı farkları mevcuttur ki bu farklardan birisi yapısında çok sayıda ( $Na^+$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $F^-$ ,  $Cl^-$ , vs.) eser miktarda iyon ile birlikte maksimum oranda ağırlıkça yaklaşık %4-8 karbonat iyonu içermesidir (Bang ve ark. 2014). Biyomalzeme olarak hidroksiapatitin olumlu yönlerinin yanında bazı dezavantajları da mevcuttur. Örneğin kırılma dayanımının zayıf, tokluğunun düşük olması gibi özellikler hidroksiapatitin bazı dokularda tercih edilmemesine yok açabilmekte ya da saf olarak kullanılmasını engellemektedir (Faksawat ve ark. 2021).

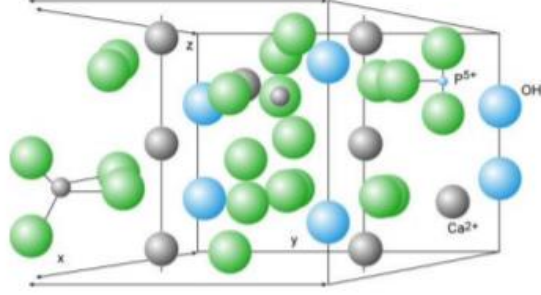
#### **2.4.2. Hidroksiapatit'in kullanım alanları**

Hidroksiapatitin vücuttaki rolü kemiğin mineral dengesini (Çakmak 2015) ve kemik büyümesini (De Lange ve ark. 1990) sağlamaktır. Buna bağlı olarak kemik ve diş dolgu malzemesi, implant malzemesi, ilaç, protein, gen yükleme ve dağıtım malzemesi olarak biyomedikal alanda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Zhou ve Lee 2011; Mantsopoulos ve ark. 2021). Proteinlerin, vitaminlerin, antibiyotik ilaçların ve hormonların insan dokularına kontrollü şekilde verilmesi için ilaçlı salınım sistemlerinde kullanılabilir. Endüstride katalizör olarak kullanılabilirdiği gibi içme sularının ya da atık suların arıtılmasında da kullanılmaktadır. Ayrıca toprak bakterilerine zarar vermediği kesinleşmiş olup böylece tarımda gübre olarak kullanımının da önü açılmıştır (Panda ve ark. 2021). Bir başka önemli kullanım alanı olarak HA'ya Ag eklemek, malzemelere antibakteriyel özellik kazandırmak için tercih edilen bir yöntemdir (Evis 2011). Uygun porozif yapısı nedeniyle ortopedide gözenekli implant sistemlerinde biyoaktif kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır (Sopyan ve ark. 2007). Nano boyutta üretildiğinde tümörün büyümesini engelleyici ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır. Ek olarak görüntüleme ve teşhis için de kullanıma aday durumdadır (Du ve ark. 2021).

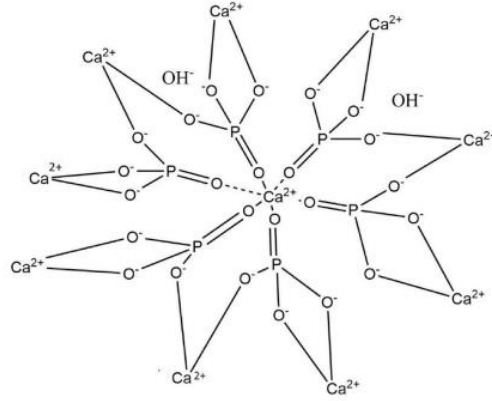
#### **2.4.3. Hidroksiapatit'in yapısı**

Hidroksiapatit, kimyasal ve biyolojik olarak insan kemik yapısına çok benzer özelliktedir ve hekzagonal veya monoklinik kafes yapısına sahiptir, Ca:P oranı ise 1.67'dir (Çakmak 2015). Hekzagonal yapıdaki kafes parametreleri;  $a=b=9.432 \text{ \AA}$ ,  $c=6.881 \text{ \AA}$  ve  $\gamma=120^\circ$ , monoklinik yapıdaki kafes parametreleri;  $a= 9.421 \text{ \AA}$ ,  $b=2a$ ,  $c= 6.881 \text{ \AA}$  ve  $\gamma=120$  şeklindedir. Sahip olduğu hidroksil iyonlarının konumları farklı olduğu için bu iki kristal fazda kafes parametreleri farklılık gösterebilmektedir (Koçak 2021).

Hidroksiapatit'in kristal yapısı (Şekil 2.7.) ve kimyasal yapısı (Şekil 2.8.) aşağıdaki gibidir.



Şekil 2.7. Hidroksiapatit kristal yapısı (Elgit 2016).



Şekil 2.8. Hidroksiapatitin kimyasal yapısı (Panda ve ark. 2021).

Apatitler, fosforun hidroksil ( $\text{OH}^-$ ), klorür ( $\text{Cl}^-$ ) veya florür ( $\text{F}^-$ ) iyonlarını içeren ve moleküler ağırlığı 1004.6 g/mol olan malzemelerdir. Kristal kafes yapısı içerisinde kovalent (P–O ve O–H) bağlar ve iyonik (Ca–O) bağlar vardır ve saf halde hidrofilik özellik gösterirler (Panda ve ark. 2021).

#### 2.4.4. Hidroksiapatit'in biyomimetik iyon yer değiştirmeleri

Hidroksiapatit kemik doku mühendisliğinde ve onun dışında birçok alanda çok sık kullanılan biyoseramik malzemedir. Sentetik olarak üretilen stokiometrik hidroksiapatitin yüksek stabilitesi nedeniyle vücutta çözünme hızı düşüktür, bu da doku iyileşme sürecini uzatmaktadır. Bu nedenle, biyolojik apatit yapısına benzer

biyomimetik iyon katkıları eklenerek HA'nin biyoçözünme davranışı ayarlanarak kemik yenilenmesini teşvik edici mineral özellikleri güçlendirilebilmektedir. Bu eklenen iyonlar (karbonat, silisyum, sodyum, potasyum, magnezyum, gümüş, çinko, stronsiyum, flor vb.) hidroksiapatitin özelliklerini iyileştirir ve uygulama alanının genişlemesini sağlar (Panda ve ark. 2021).

Hidroksiapatite eklenen bazı önemli biyomimetik iyonlar aşağıda ele alınmıştır.

#### **2.4.4.1. Karbonat**

Karbonatın HA'ya eklenmesinin temel nedeni HA'nın biyolojik aktivitesini iyileştirmektir. Bunun nedeni, karbonat eklenmesiyle değişen en belirgin özelliklerin malzeme çözünürlüğünde artış, kristalliğinde azalma ve kimyasal reaktivitede artış olmasıdır (Lee ve ark. 2008). Diğer bir eklenme nedeni ise karbonatın çözünürlüğünün yüksek olması ve osteoklastlar tarafından hızlı emilerek yeni kemik oluşumunu desteklemeleridir. Ayrıca kemik oluşumu için gerekli olan kalsiyum ve fosfat iyonlarının konsantrasyonunu artırır. Eklendikleri çözeltinin pH'ını arttırırlar ve bu da apatitin çekirdeklenmesini kolaylaştırır (Bang ve ark. 2014). HA'da iyileştirdiği en önemli özelliklerden bir diğeri de osteoblastik hücre yapışmasını, büyümesini ve farklılaşmasını desteklemesidir (Granito ve ark. 2018).

#### **2.4.4.2. Silikat**

Kemik dokuları için gerekli olan silisyum, Ca ve P malzemelerinin biyolojik aktivitesini doğrudan etkiler. Normal kemik osteoblastların hücre kültürlerinin ortosilisik asit ile desteklenmesinin ardından, alkalın fosfataz ve osteokalsin aktivitelerinde artış gözlemlenmektedir. Buna bağlı olarak da kollajen sentezi de artarak kemik büyümesi hızlanmaktadır. Ayrıca malzemenin yüzeyinde silisyumun varlığı, osteojenezi de artırabilmektedir.  $\text{Si(OH)}_4$  formundaki silisyum implanttan hücre dışı ortama salındığında biyolojik aktivite artarak doku yenilenmesi hızlanmış ve kemik yeniden şekillenme süreci olumlu yönde etkilenmiş olmaktadır. Silikat iyonu, eklendiği malzemede fosfat grubu ile yer değiştirerek tane boyutunun küçülmesine, buna bağlı olarak çözünürlüğün artmasına neden olur (Pietak ve ark. 2007).

#### **2.4.4.3. Magnezyum**

Magnezyum elementi doğal kemik ve kırıldak dokuda yüksek konsantrasyonda bulunur ve kemik olgunlaşmaya devam ettiği sürece kaybolmaya başlar. Magnezyum miktarının azalması demek kemik büyümesinin durması, vücuttaki dengeli yapım yıkım aktivitesinin oranının bozulması ve kemiğin kırılğan bir yapıya dönüşmesi demektir. HA'ya magnezyum iyonu eklenmesi halinde, malzemenin çekirdeklenme hızını arttırmakta ve kristalleşme süresini doğrudan etkilemektedir. Osteoblastik ve osteoklastik aktivitelerin dengelenmesi, tane boyutunun küçülerek çözünürlüğün artması da bu şekilde sağlanmış olur (Landi ve ark. 2006; Evis 2011).

#### **2.4.4.4. Florür**

Hidroksiapat'e flor iyonu eklendiğinde malzemenin mikro sertliği artmakta ve buna bağlı olarak korozyon direnci de artmaktadır (Evis 2011). Malzemeye florürün eklenmesi, hidroksiapatit bazlı malzemelerin remineralizasyon performansını iyileştirmektedir. Bu özellik hidroksiapatite florür eklenerek kullanılmasındaki en büyük etkidir (Du ve ark. 2021).

#### **2.4.5. Hidroksiapatit sentez yöntemleri**

Birçok HA sentez yöntemlerinden en yaygın olarak kullanılanlar, kimyasal çöktürme, sol-jel yöntemi ve hidrotermal yöntemdir (Panda ve ark. 2021).

##### **2.4.5.1. Hidrotermal yöntem**

Hidrotermal sentez yöntemi, kalsiyum ve fosfat içeren sulu ortamda sıcaklık ve basınç parametrelerine bağlı gerçekleşen bir yöntemdir. Prosesin tamamlanması yaklaşık 24 saat sürmektedir ve 60-150°C sıcaklıkta, otoklav veya basınçlı kap gibi yüksek sıcaklık ve basınca sahip bir ortamda gerçekleşir. Basınç ve sıcaklık reaktiviteyi arttırarak yoğunlaşmanın etkisi ile kimyasal bağları güçlü ve yüksek kristalli bir HA üretimini sağlayan bir kristal oluşturur. Bu yöntemin dezavantajı daha çok küçük boyutlu partiküller için tercih ediliyor olmasıdır. Bu dezavantajlar üzerine çalışmalar devam etmektedir (Pu'ad ve ark. 2020; Koçak 2021).



#### **2.4.5.2. Kimyasal çöktürme yöntemi**

Kimyasal çöktürme yöntemi, hidroksiapatit sentez yöntemleri arasında işlem basitliği ve maliyet açısından en uygun yöntemdir. Sentez sonucu yan ürün olarak su oluşur ve bu oluşan ürün zararsızdır. İşlem 100 °C'nin altında gerçekleşiyor olması yöntemin kolay olduğunu göstermektedir. Öncelikle alkali ve asit çözeltiler hazırlanarak işleme başlanır. Ardından sırasıyla çöktürme, yaşlandırma ve filtrasyon, kurutma ve ısıtma adımları gerçekleştirilir. Buradaki önemli olan husus, yöntemin tekrarlanabilirliğidir. Bu amaçla reaksiyon sıcaklığı (100°C'nin altında), asit ekleme hızı, ısıtma işlem sıcaklığı gibi parametreler dikkate alınmalıdır (Pu'ad ve ark. 2020).

#### **2.4.5.3. Sol-jel yöntemi**

Sol jel yöntemi, hidroksiapatit sentez yöntemlerinden en başarılı sonuç alınan yöntemdir. İşlem tekrarlanabilirliği ve kolaylığı yönünden çok sık tercih edilir. Reaktifler, moleküler düzeyde karışmış olması ve homojen partiküller elde edilmesi sentezin en büyük avantajlarıdır. Bu proseste partikül boyutu ve partikül şekli gibi özellikleri kontrol etmek mümkündür. Düşük sıcaklıkta gerçekleştirilebilmesi ve basınç gerektirmemesi yanı sıra sol-jel yöntemi yüksek saflıkta ürün eldesini sağlar. Reaksiyon sıcaklığı kimyasal çöktürme yönteminde olduğu gibi 100 °C'nin altındadır. Sol-jel yönteminin tek dezavantajı ise sentez süresinin uzun olmasıdır. Ayrıca, sol-jel yöntemi ile üretilen hidroksiapatitin biyolojik apatit yapısına benzer özellikler sergilediği bildirilmektedir (Koçak 2021).

### **2.5. Zeolitler ve Klinoptilolit**

Porozif yapıya sahip olan zeolitler doğada doğal ya da yapay şekilde bulunabilen alümina silikat bileşikleridir. Isıtıldıklarında yapılarındaki su köpürür ve buna bağlı olarak köpüren taş anlamına gelen zeolit adını alırlar. Türkiye'de de zeolit rezervleri mevcuttur. Kolay elde edilebilen, kabul edilmiş 82 farklı türünün olması ve işlevsel bir malzeme olması nedeniyle akademik ve endüstriyel çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Armbruster ve Gunter 2001; Tok 2009).

### 2.5.1. Zeolitlerin genel özellikleri

Rezervinin çok olması, zeolitleri ucuz hammaddeye dönüştürmektedir fakat bazı sektörlerdeki kullanım alanları daha yeni keşfedilmeye başlayıp yakın zamanda ivme kazanmıştır. Rezervinin fazlalığına ek olarak sahip olduğu homojen porozif yapısı, iyon değişimi, adsorpsiyon yapabilme yeteneği, katalizör olarak kullanılabilme gibi özellikler sayesinde endüstriyel ve akademik alanda kendine yer açmaktadır. Bilenen en temel kullanım alanları; tarım ve hayvancılık faaliyetleri, çevresel kirlilik kontrolü, biyomedikal ve doku mühendisliği, enerji, inşaat, teknoloji gibi alanlardır (Gülen ve ark. 2012; Koçak ve ark. 2022).

Doku mühendisliği ve tıp alanında kullanımına örnek olarak kemik hücrelerinin yenilenmesi, farklılaşması gibi çalışmalarda kullanılmaktadır. Hücre yenilenmesine olan olumlu katkısı, zeolitin yara iyileştiri olarak da kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Porozif yapısı sayesinde kontrollü ilaç salınım sistemlerinde tercih edilmektedir. Ayrıca kemik doku mühendisliğinde metalik implantların kaplanarak metalik malzemeyi daha biyouyumlu hale getirmekte ve korozyonu minimum seviyeye indirmektedir (Bacakova ve ark. 2016).

Zeolit molekülü, kimyasal formülü  $[Al_{nx}Si_{n(4-x)}O_{n8}]^{nx-}$  şeklinde üç boyutlu kafes yapısına ve 3-7 Å boyutta gözeneğe sahip sulu alüminasilikattır. Yüzey alanının geniş olması, farklı boyuttaki moleküllere karşı seçici geçiricilik sağlaması, iyon değişimi yeteneği gibi karakteristik özelliklere sahip olması hammadde olarak kullanılması için malzemeye avantaj kazandırmaktadır (Kianfar 2020; Koçak ve ark. 2022). Zeolitlerin yapısında bulunan su, düşük sıcaklık ve basınçta oluşabilmesine olanak sağlar. Böylece adsorban özellik kazanmak için gerekli olan gözenekli bir yapı ve daha düşük yoğunluk özelliği ortaya çıkar. (Armbruster ve Gunter 2001). Zeolitler arasından klinoptilolit gibi biyouyumlu türleri çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanım alanı bulmaktadır. (Nouri ve ark. 2020).

### 2.5.2. Zeolitlerin hidroksiapatit ile birlikte kullanımı

Hidroksiapatitin çözünme hızı ve biyoaktivitesi biyolojik apatite göre daha düşük olmasına bağlı olarak osteointegrasyon süresi uzundur. Hidroksiapatitin osteointegrasyon süresini kısaltmak için sinterleme sıcaklığının değiştirilmesi,

gözenekli yapı kazandırma gibi yöntemler üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda hidroksiapatite silika bazlı malzemeler (örneğin zeolit) eklendiğinde osteoiletkenliğinin ve osteokondüktivitenin iyileştiği gözlemlenmiştir. Silika bazlı malzemelerin en önemli özelliği vücut sıvısına daldırıldığında apatit tabakası üretmesidir ve bu özellik sayesinde implant ile kemik arasındaki etkileşim artar. Böylece kemik dokusu onarım hızı ve kalitesi artmış olur. Ayrıca biyoyumlu zeolitlerin Kemik Doku Mühendisliği ile ilaç salınımı gibi biyomedikal alanlarda kullanım potansiyeli artmaktadır (Iqbal ve ark. 2016).

### **2.5.3. Klinoptilolit**

Biyolojik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen, silisyum bakımından oldukça zengin doğal bir zeolittir. Sıklıkla tercih edilmesinin en önemli nedeni ise biyolojik dokularla olan yüksek uyumu ve toksikolojik çalışmalarda toksik olmadığı tespit edilmiş olmasıdır. Diğer nedenlerinden biri de poroz ve hekzagonal yapısının medikal uygulamalara oldukça elverişli olmasıdır. Ayrıca Türkiye saf zeolit rezervi açısından zengin bir ülkedir (Kalkandelen ve ark. 2017).

#### **2.5.3.1. Klinoptilolit'in kristal yapısı ve özellikleri**

Kimyasal formülü  $(Na, K, Ca)_4Al_2Si_{30}O_{72}24H_2O$  olan 4-4-1 grubuna dahil doğal zeolit mineralidir. Yapısında en fazla Na, daha az miktarlarda ise K, Ca, Mg katyonları bulunur. Silika bakımından çok zengin olması nedeniyle ısıya karşı dayanıklılığı yüksektir, kristal yapısı 700 °C'ye kadar stabilitesini koruyabilir ve aside karşı dayanıklılığı yüksek bir zeolittir. Klinoptilolit'in en önemli dört özelliği; yüksek iyon değiştirme kapasitesi, adsorptiflik, moleküler elek olarak kullanılabilme ve katalizörlüktür. Si/Al oranı 4,0 ile 5,3 arasında değişmekte olup bu orana bağlı olarak iyon değiştirme kapasitesi ve adsorptiflik özellikleri de değişmektedir. Ayrıca %34 oranında gözeneklilik özelliğine sahiptir ve bu özellik klinoptilolite büyük bir avantaj kazandırmaktadır (Tok 2009; Ambrozova ve ark. 2017; Pavelić ve ark. 2018; Polat ve ark. 2004 ).

### 2.5.3.2. Klinoptilolit'in Kullanım Alanları

Klinoptilolit'in yüksek iyon değiştirme kapasitesi sayesinde sıvı atık içerisindeki kirleticilerin giderilmesinde antibakteriyel olarak, radyoaktif atıklardan Cs ve Sr'nin uzaklaştırılmasında, içme suyunda kötü kokuya neden olan amonyumun uzaklaştırılmasında; adsorptif özelliği sayesinde doğal gazların saflaştırılmasında; mikroelek ve katalizör özelliği sayesinde ise ksilenin izomerizasyonu, metanolün dehidrasyonu gibi alanlarda kullanılabilir. Yani evre sağlığı, teknoloji, tarım, tıp gibi birçok alanda araştırma ve uygulama konusu olarak yer almaktadır. Doğal bir zeolit olan klinoptilolit, endüstriyel kullanım alanının yanında tıbbi uygulamalarda (antiviral, antitümöral, antidiyarel çalışmalar) da kendine büyük bir yer açmıştır (Joughehdoust ve Manafi 2008; Kalkandelen ve ark. 2017).

### 2.5.3.3. Klinoptilolit'in biyomedikal alanda ve doku mühendisliğinde kullanımı

Yapılan çalışmalara göre, diyabetik hastalıklarda, bağırsak rahatsızlıklarında, bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde tedavi yöntemi olarak kullanılabilir (Paveli ve ark. 2001). Son yıllarda yapılan çalışmalara göre klinoptilolit'in *in-vivo* kullanım alanında da yaygınlaştığı görülmektedir (Paveli ve ark. 2018).

Klinoptilolit, birçok alanda tercih edilmekte olup, bu çalışmanın temelini oluşturan biyomedikal ve Doku Mühendisliği uygulamalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalara göre klinoptilolit'in, iyon değişimi, adsorpsiyon ve kataliz gibi spesifik özellikleri sayesinde ilaç endüstrisi ve tıptaki kullanımı son yıllarda hızla artmaktadır. Bu artışın sebebi biyolojik ve kimyasal stabilitesinin yüksek olması ve kk molekülleri geri dönüşümlü olarak bağlayabilme özelliğinin olmasıdır. Ayrıca gözenekli bir yapıya ve immünomodülatör aktiviteye sahiptir (Bogdanov ve ark. 2009).

Ülkemizde ve dünyada yapılmış olan klinoptilolit'in biyomedikal uygulamalarına örnek verilecek olursa; Klinoptilolit dolgululu PVA membranı ile yapılan bir çalışmada, kullanılan dolgu malzemesinin membranın fiziksel, kimyasal ve termal özelliklerini iyileştirdiği tespit edilmiştir (Tırnakçı ve ark. 2020). Diğer bir çalışmada, antimikrobiyal özelliği kullanılarak yara iyileştirici malzeme olarak kullanılabilirliğini araştırmak üzerine olup klinoptilolit'in osteointegrasyonu arttırdığı ve hücre yenilenmesini hızlandırarak yaranın iyileşmesini hızlandırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca antikanser ve

bağışıklık sistemini güçlendirici olarak da kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Kuruca ve ark. 2020). Ek olarak klinoptilolit, viral partiküllerin inaktivasyonunda oral olarak herhangi bir toksik etki oluşturmadan kullanılabilir ve buna bağlı olarak da enterovirüs ve adenovirüsler gibi sindirim kanalını etkileyen virüsler açısından önemlidir. Yani bağışıklık sisteminin düzenlenmesine olumlu katkısının olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. İyi bir aşı adjuvantı olarak kullanılabilmesi de klinoptiloliti önemli bir malzeme haline getirmektedir (Karaoğlan 2017). Bacakova ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise biyosensör materyali olarak kullanılıyor olması üzerinedir. Biyosensör olarak kullanımının ek olarak kanser ve tümör gibi hastalıkların teşhisinde kolaylık sağlamakta olduğuna değinilmiştir (Bacakova ve ark. 2016). Iqbal ve arkadaşlarının 2016 yılında kitosan filmlerine zeolit katkısının etkisini incelemek amacıyla yapmış olduğu çalışmada klinoptilolit içeren filmlerin su buharı geçirgenliğinin daha düşük olduğunu ve bu sayede termal direncin arttığını gözlemlemiştir. Bu iyileştirdiği özellik yanık ve yaraların iyileşmesini hızlandırmak için örtü malzemesi olarak kullanımına olanak sağlamaktadır (Iqbal ve ark. 2016; Koçak ve ark. 2022).

Klinoptilolitin kemik doku mühendisindeki bilinen bir kullanım alanı kemik iskelesi olarak kullanımınıdır. Kemik iskelesine hidroksiapatit eklendiğinde hücrenin biyoyararlanımı artar. Bu demektir ki, biyoaktif seramik olan hidroksiapatit toksik olmaması ve biyoyararlanımı arttırması gibi sebeplerle biyoyumluluğu da arttırmış olur. Fakat kırılma olması, mekanik özelliklerinin zayıf olması gibi dezavantajlar hidroksiapatitin klinik uygulamalarda kullanımını kısıtlayan özelliklerdir. Hidroksiapatitin mekanik özelliklerini iyileştirmek için kullanılan çeşitli katkılardan birisi de silika içeren nanoparçacıklardır. Alümina silikat mineralleri olan zeolitler ihtiyaç duyulduğu üzere, silika bakımından zengin, süngerimsi gözeneklere sahip ve biyoyumluluğu yüksek doğal nanoparçacıklardır. Ayrıca klinoptilolitin hücre içine su alımını kısıtlayarak hücreyi hidrolizden koruduğu, kompozit yapı iskelesinin bozunma oranını azalttığı ve hücre büyümesini hızlandırdığı gözlemlenmiştir (Sadeghinia ve ark. 2020).

Metalik elementlerden gümüş ve çinko elementlerinin antibakteriyel özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu metallere zeolit arasında katyon değişimi meydana geldiğinde zeolite antibakteriyel özellik kazandırılabilir (Top ve Ülkü 2004).

Doğal bir zeolit olan klinoptilolit, antibakteriyel özelliğine dair çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda Escherichia Coli (gram negatif) ve Staphylococcus Aureus (gram pozitif) bakterileri üzerindeki yok edici etkileri incelenmiş olup olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle katyon değişimli klinoptilolit, genel amaçlı dezenfektan olarak kullanılabilir. Bu özelliği sayesinde tıp alanında kaplama malzemesi olarak kullanımı tercih edilebilir. Antibakteriyel özellik, bu malzeme için kaplama dışında da birçok kullanım alanını da beraberinde getirmiştir. Örneğin akne tedavisinde kullanılabilmesi bunlardan bir tanesidir (Colella 2011).

Kemik skafold uygulamaları için klinoptilolite doğal sığır kemiğinden üretilen hidroksiapatit katkısı ile alümina ( $Al_2O_3$ ) katkısı eklenerek doğrudan karıştırma, presleme ve sinterleme yoluyla üretilen kompakt yapıların mekanik özelliklerin artırıldığı bildirilmektedir (Kalkandelen ve ark. 2017).

Hidroksiapatit kemik iskelesine klinoptilolit eklenmesiyle basınç dayanımı ve yüzey sertliği gibi özelliklerin iyileştiği, porozitif yapının korunduğu, hücre çoğalmasında artış olduğu gözlemlenmiş olup Kemik Doku Mühendisliği'nde kullanılmak için uygun bir kompozit yapı oluşturulduğu yapılan analiz sonuçlarına bakılarak uygun görülmüştür ve ilerdeki çalışmalara da ışık olacağı düşünülmektedir (Alshemary ve ark. 2019).

### 3. BÖLÜM

#### MATERYAL ve YÖNTEMLER

##### 3.1. Malzemeler

Deneyleerde kullanılmak üzere kalsiyum nitrat ve diamonyum hidrojen fosfat (Merck, Almanya); %99.9 saflıktaki etanol (Fluka, Almanya); amonyak (Isolab, Almanya) kimyasalları tedarik edilmiştir. Doğal klinoptilolit numunesi Rota Madencilik Firması (Manisa, Türkiye) tarafından hediye edilmiştir. Tüm deneysel çalışmalarda Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (NEVÜ-BTUAM) tarafından sağlanan ultra saf su kullanılmıştır.

##### 3.2. Sol-jel Yöntemi ile Saf Hidroksiapatit Üretimi

Saf hidroksiapatit tozu üretimi için Kocak tarafından uygulanmış olan protokol modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Koçak 2021). Sol-jel reaksiyonu, 70 °C'ye ayarlanmış ve reaksiyon boyunca da bu sıcaklıkta tutulacak olan bir düzenek hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu düzenek Şekil 3.1'de görüldüğü gibi ceketli ısıtmalı karıştırıcı içerisine yerleştirilmiş üç boyunlu bir cam balon içerisinde ve çözeltinin buharlaşmasını engelleyecek şekilde kondansatör desteğiyle düzenlenmiştir.

Ca ve PO<sub>4</sub> öncüsü olarak sırasıyla Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (Kalsiyum Nitrat tetra-hidrat) ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.HPO<sub>4</sub> (Diamonyum Hidrojen Fosfat) bileşikleri kullanılmıştır. Çözeltinin pH'ını ayarlamak için ise amonyak kullanılmıştır. Tepkime çözeltileri 0.5 M Ca ve 0.3 M PO<sub>4</sub> iyonlarının sitokiyometrik oranında ve eşit hacimde çözeltileri hazırlanmıştır. Çözünme gerçekleştikten sonra her iki çözeltinin de pH'ı kontrollü şekilde amonyak eklenerek 10.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından karıştırıcı aktif haldeyken Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O çözeltisine (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.HPO<sub>4</sub> çözeltisi damla damla olacak şekilde aktarılarak reaksiyon başlatılır. Reaksiyon sırasında 4 saat boyunca her saatte ölçüm yapılarak pH'ın 10.0 olması için amonyak eklemesi yapılarak tepkime süresi boyunca pH'ın sabit kalması sağlanır. 4 saatin sonunda çözelti 15 dk bekletilip ardından 5-13 µm filtre kağıdı ile süzülür. Ardından 100 °C fırında 24 saat kurutma ve havanda öğütme sonrası kurutulmuş toz numuneler elde edilmiştir. Ayrıca numunelere kuru hava

ortamında 3 saat boyunca yüksek sıcaklık fırınında farklı sıcaklıklarda (800 °C, 950 °C ve 1100 °C) sinterleme işlemleri uygulanmıştır.



Şekil 3.1. Reaksiyon Düzenegi: Üç boyunlu cam reaksiyon haznesi karıştırılmalı ve sıcaklık kontrollü ceketli reaktör içerisine yerleştirilerek çözücülerin buharlaşması engellenecek şekilde üstten kondansatör ile bağlanmıştır. Yan tarafından daldırılan sıcaklık probu sayesinde sıcaklık sürekli olarak kontrol altında tutulmuştur.

### 3.3. Sol-jel yöntemi ile klinoptilolit katkıli hidroksiapatit üretimi

Saf hidroksiapatit üretiminde kullanılan sentez yönteminin ve düzeneginin aynısı kullanılarak sentez yapılmıştır. Klinoptilolit miktarının etkilerini incelemek için bu aşamada kalsiyum nitrat bileşiğine farklı oranlarda klinoptilolit eklemesi yapılmıştır. Deney için %5, %10 ve %20 katkı konsantrasyonları seçilmiştir. Şekil 3.2' de sentez aşamalarındaki hidroksiapatit formları gösterilmiştir. Stokiyometrik orandaki çözeltiler eşit hacimde hazırlanmıştır. %5 klinoptilolit katkısı için Ca öncüsünün %5'i kadar klinoptilolit eklenmiştir. %10 ve %20 katkıli konsantrasyonlar için de aynı işlem tekrarlanmıştır.

Saf ve CLP katkıli HA numuneleri 800 °C, 950 °C ve 1100 °C'de sinterlenmiştir. Numune isimleri sembolleriyle birlikte tablo 3.1.'de verilmiştir.



Tablo 3.1. Deney numuneleri ve uygulanan işlemler tablosu

<u>Numune Adı</u>	<u>Uygulanan işlem</u>
1D	Saf HA (24 saat 100 °C'de kurutulmuş)
1S 800	Saf HA (800 °C'de sinterlenmiş)
1S 950	Saf HA (950 °C'de sinterlenmiş)
1S 1100	Saf HA (1100 °C'de sinterlenmiş)
2D	%5 CLP + HA (24 saat 100 °C'de sinterlenmiş)
2S 800	%5 CLP katkıli HA (800 °C'de sinterlenmiş)
2S 950	%5 CLP katkıli HA (950 °C'de sinterlenmiş)
2S 1100	%5 CLP katkıli HA (1100 °C'de sinterlenmiş)
3D	%10 CLP + HA (24 saat 100 °C'de sinterlenmiş)
3S 800	%10 CLP katkıli HA (800 °C'de sinterlenmiş)
3S 950	%10 CLP katkıli HA (950 °C'de sinterlenmiş)
3S 1100	%10 CLP katkıli HA (1100 °C'de sinterlenmiş)
4D	%20 CLP + HA (24 saat 100 °C'de sinterlenmiş)
4S 800	%20 CLP katkıli HA (800 °C'de sinterlenmiş)
4S 950	%20 CLP katkıli HA (950 °C'de sinterlenmiş)
4S 1100	%20 CLP katkıli HA (1100 °C'de sinterlenmiş)



Şekil 3.2. Sentez Aşamaları: a. Klinoptilolit katkıli hidroksiapatit filtrasyon sonrası kremi formdadır; b. Klinoptilolit katkıli hidroksiapatit kurutma sonrası katı formdadır; c. Klinoptilolit katkıli hidroksiapatit öğütme sonrası toz formdadır.

### 3.4. Karakterizasyon Çalışmaları

Bu bölümde hazırlanan saf ve katkılı, ayrıca farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş hidroksiapatit tozlarının kimyasal, morfolojik ve termal özelliklerinin analiz edilmesinde kullanılan yöntemler anlatılmaktadır. Kullanılan analiz teknikleri ve bu analizlerin gerçekleştiği yerler şu şekildedir; XRD (X-Işını Kırınımı) ve TGA/DTA (Termogravimetrik Analiz/ Diferansiyel Termal Analiz) Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi BTUAM ve F-TIR(Fourier Dönüştümlü Kızılötesi) Spektroskopi analizleri Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Kimya Bölümü; BET (Brunauer-Emmett-Teller), SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu), EDX (Enerji Dağılımı X-Işını Analizi), XRF (X-Işını Floresans) ve S-TEM (Taramalı-Geçirimli Elektron Mikroskobu) analizleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (TAUM); Mekanik basma testi NEVÜ Mimarlık-Mühendislik Fakültesi Laboratuvarı; Biyoyumluluk testleri ise Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı birimlerinde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.4.1. XRD analizi

X-Işını Kırınımı (XRD) analizleri Rigaku marka Miniflex 600 model X-Işını Difraktometresi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Toz hale getirilmiş olan numune için analiz şartları belirlenerek başlanır. Analizler Cu-K ışığı kullanılarak 10°/dk hızında, 0.02°'lik adım genişliğinde gerçekleştirilmiştir ve 5°-90° tarama aralığında ve 2-teta değerleri arasındaki değerler seçilmiştir. Daha sonra özel numune tutuculara konularak XRD cihazlarının özel örnek localarına yerleştirilir ve analiz edilir. Toz örneklerin ya da ince filmlerin X-ışını kırınım deseni elde edildikten sonra yapılan kalitatif analizlerde, ICDD kartlarında bulunan diğer maddeler ile karşılaştırma yapılarak fazlar belirlenmektedir. XRD model grafikleri GraphPad Prism (Sürüm 7.0, San Diego, CA, ABD) yazılımında çizilmiştir.

#### 3.4.2. TG/DTA analizi

Eş zamanlı TG/DTA analizleri Shimadzu marka TG DTA 60 model cihaz ile gerçekleştirilmiştir. İnert atmosfer gazı olarak azot (N<sub>2</sub>) varlığında oda sıcaklığından 1000 °C'ye kadar 10 °C/dk ısıtma hızı ve 150 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir.

TG/DTA model grafikleri GraphPad Prism (Sürüm 7.0, San Diego, CA, ABD) yazılımında çizilmiştir.

### **3.4.3. BET analizi**

BET analizleri Micromeritics marka Gemini VII Surface Area and Porosity model cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Analizde 0,1-0,3 g numune tartılarak içerisindeki gazların uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla öncelikle 180 °C sıcaklıkta 24 saat ön ısıtma işlemi uygulanmıştır. Ardından adsorpsiyon-desorpsiyon eğrileri elde edilerek hesaplamalar sonucu toplam yüzey alanı ve por boyutu bilgileri elde edilmiştir.

### **3.4.4. SEM, S-TEM ve EDX analizleri**

SEM, S-TEM ve EDX analizleri Zeiss marka Gemini 500 model cihaz yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

SEM analizleri öncesi numunelerin yüzeyi 45 Å kalınlığında olacak şekilde Au:Pd (80:20 kaplama yapılmıştır. Görüntüler 3 kV voltajda ve 1.000, 5.000, 10.000, 50.000 ve 100.000 büyütme oranlarında elde edilmiştir.

S-TEM analizleri için toz numuneler saf etanol içerisinde sonikator ile dağıtılarak homojen olması sağlanmıştır. Bu homojen süspansiyondan birkaç damla alınarak Cu-grid üzerine damlatılıp 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 25 kV voltajda 50.000, 100.000 ve 150.000 büyütme oranlarında elde edilmiştir.

EDX analizinde ise alan haritalama tekniği ile element dağılım haritaları ve grafikleri elde edilmiştir.

### **3.4.5. XRF analizi**

Numunelere ergitme/ presleme ön işlem uygulamasının ardından analizleri Panalytical marka Axios Advanced model cihaz ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.6. FT-IR analizi**

Pelkin Elmer marka Spektrum 100 model cihaz ile analizler gerçekleştirilmiştir. ATR tekniği kullanılarak 500-4000 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında 4 tarama sonrası spektremler elde edilmiştir.

### **3.4.7. Mekanik basma testi**

Üretilen toz numuneler 10 mm'lik çap ve yüksekliklerde preslenerek (1 dk bekleme süresi ile 50 MPa basınçta) farklı sıcaklıklarda sinterleme sonrası mekanik analizleri Raagen ETM-10-S cihazıyla 1 mm/dk hızında basma mukavemetleri ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.8. Biyouyumluluk ve sitotoksite testi**

Biyoyumluluk analizleri WST-8 tekniği ile numunelerin kemik türevli osteosarcoma hücreleri (Saos-2) kullanılarak 24, 48 ve 72 saat olmak üzere 3 farklı zaman diliminde gerçekleştirilmiştir. Saos-2 hücre hattının (ATCC kökenli, pasaj no:12) çoğaltılabilmesi için %10 FBS (Pan Biotech P30-1301) içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır ve bu çoğalma işlemi 75-T Flask içerisinde gerçekleştirilmiştir. Trypan mavisi (Gibco, 1525061) uygulanan hücreler için Logos Luna II cihazı kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına  $10^4$  hücre gelecek şekilde hücre ekilerek ardından %10 FBS'li DMEM besiyeri eklenmiştir.

20 mg olarak tartılan toz numuneler otoklavda 15 dakika boyunca sterilize edilerek 1 mL DMEM besiyeri ile karıştırılıp 1 saat süreyle sonikatör ile homojenize edilmiştir. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve blank olarak hazırlanan solüsyonlar kuyucuklara 3 tekrarlı olacak şekilde yerleştirilmiştir. Negatif kontrol; hücre ve besiyerinden hazırlanan, pozitif kontrol; bunlara ilave 2  $\mu$ l  $H_2O_2$  eklenmiş hali ve blank ise sadece besiyerinden oluşan kuyucuktur.

Test numunelerinin hücreler üzerine uygulanmasının ardından 22 saat boyunca inkübe edilir. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından kuyucuk hacminin %10 kadar WST-8 solüsyonu eklenerek plakalar 2 saat boyunca ışık geçirmeyecek şekilde folyo ile kaplanarak inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra 450 nm dalga boyunda solüsyonların absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemler 48 saat ve 72 saat sonrası canlılık testleri için de tekrar edilmiştir.

## 4. BÖLÜM

### BULGULAR

#### 4.1. Sol-jel yöntemi ile Saf ve Klinoptilolit Katkılı Hidroksiapatit Üretimi

Detaylı üretim adımları Bölüm 3.2 ve 3.3.'te verilmiştir. Saf HA, %5, %10 ve %20 CLP katkılı HA sentezlenerek numuneler Tablo 3.1' e göre adlandırılmıştır. Numuneler analiz edilerek CLP katkısının HA'nın kimyasal, morfolojik, termal, mekanik ve sitotoksosite özelliklerine etkileri incelenmiştir.

#### 4.2. Karakterizasyon Yöntemleri

Kimyasal analizler, morfolojik analizler, termal analiz, mekanik ve biyouyumluluk testleri yapılmıştır.

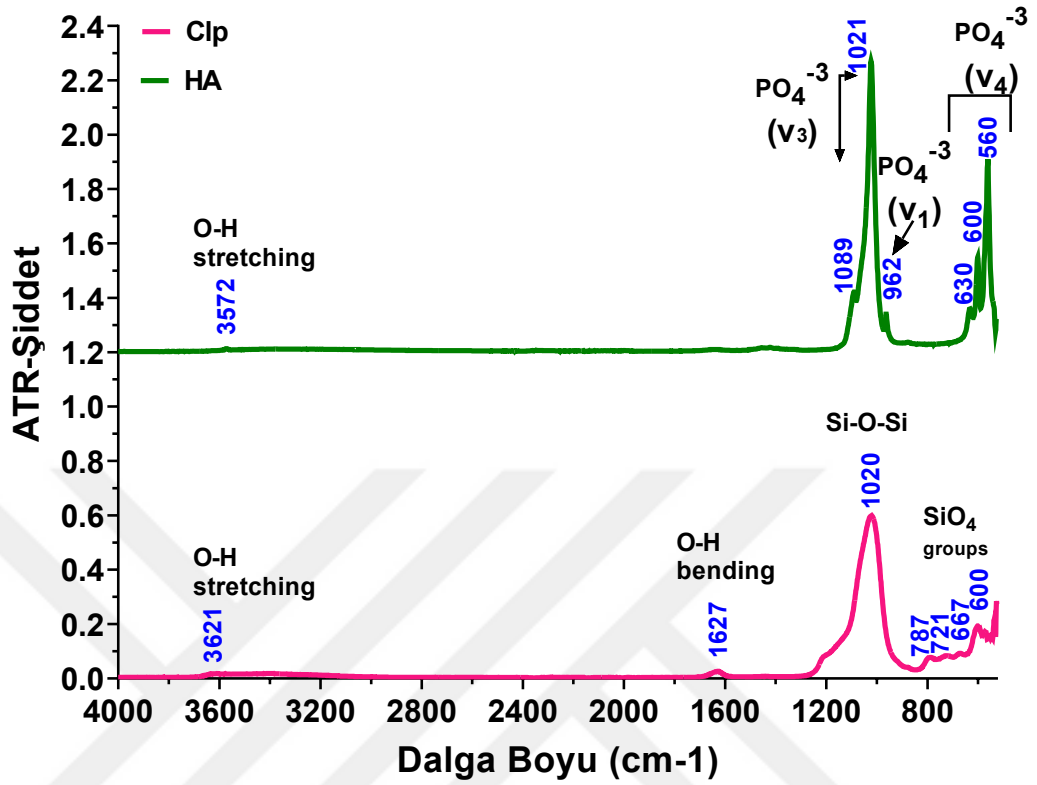
##### 4.2.1. Kimyasal analizler

Bu çalışma kapsamında hazırlanan numuneler için FT-IR, XRD, XRF, EDX analizleri yapılarak sonuçlar incelenmiştir.

##### 4.2.1.1. FT-IR analizi

Sentezlenen kurutulmuş saf HA ve doğal CLP numunelerine ait ATR-IR kimyasal analizlerine ait ATR spektrumları Şekil 4.1'de verilmiştir.

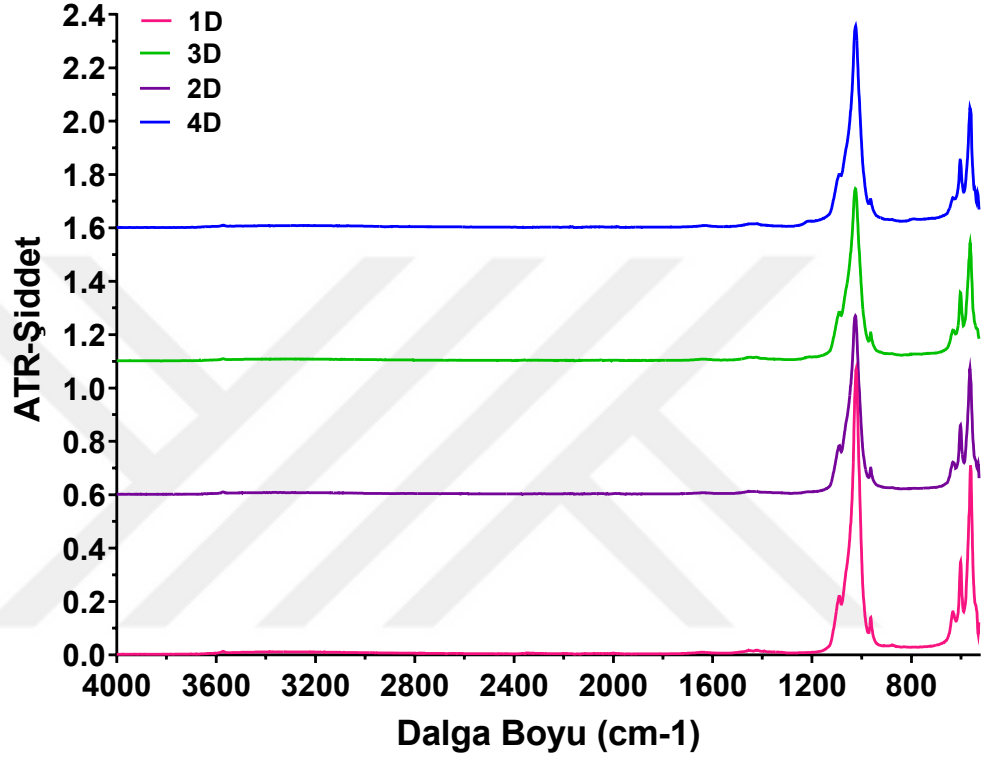
Sonuçlara göre, HA numunesinde  $3572\text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda yer alan pik hidroksil (O-H) gruplarına ait simetrik olmayan uzama vibrasyon türüne atfedilmiştir.  $1021\text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda ve solunda yer alan pikin ( $1089\text{ cm}^{-1}$ 'de) karakteristik  $\text{PO}_4^{-3}$  ( $\nu_3$ ) grubuna ait olduğu belirtilir. Raman spektroskopisinde daha çok aktif olan  $\text{PO}_4^{-3}$  ( $\nu_1$ ) grubu ise  $962\text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki pik olarak yer almaktadır.  $\text{PO}_4^{-3}$  ( $\nu_4$ ) fonksiyonel grupları ise azalan şiddet ile sırasıyla  $560\text{ cm}^{-1}$ ,  $600\text{ cm}^{-1}$  ve  $630\text{ cm}^{-1}$  dalga boylarında görülmektedir (Rehman ve Bonfield 1997).



Şekil 4.1. Saf HA ve CLP numunelerine ait ATR analiz spektrumları

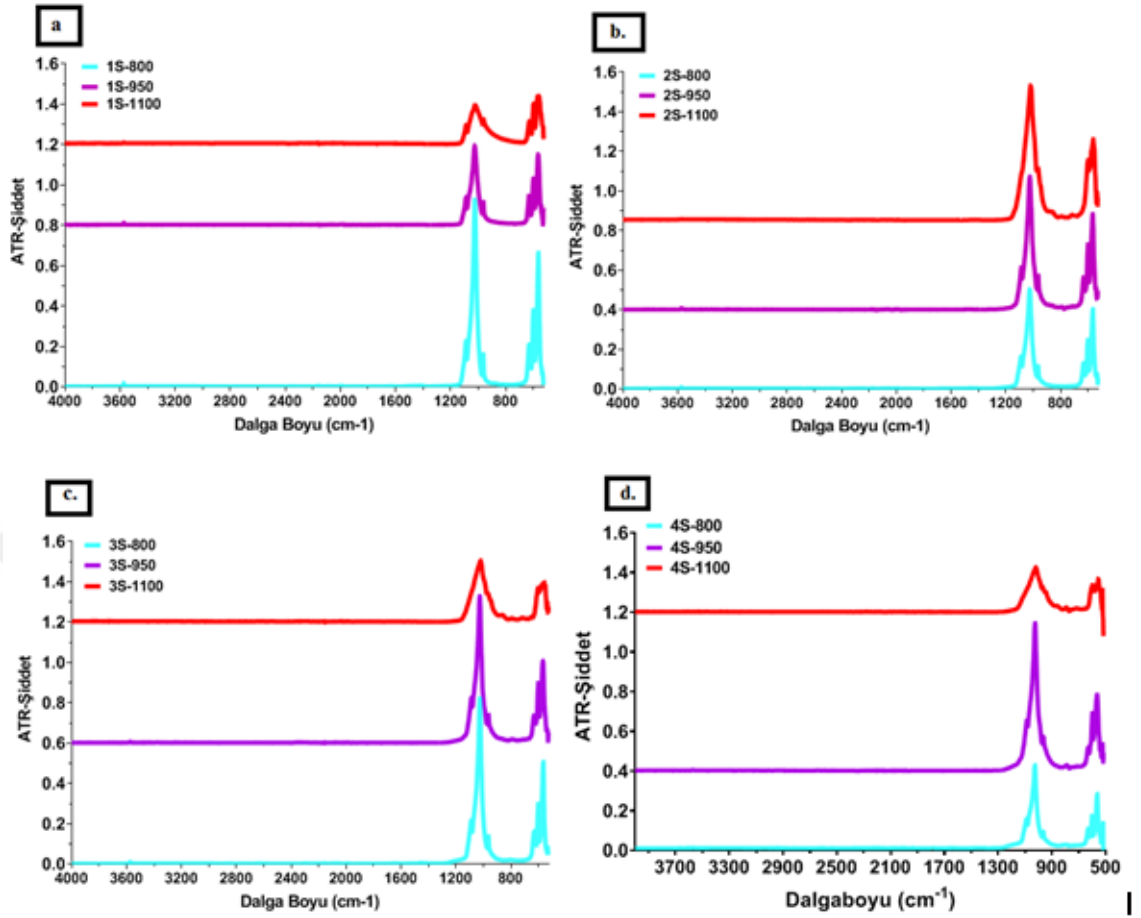
Klinoptilolit numunesine ait spektrumda 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında bulunan bölge Si-(OH) grupları uzama titreşimlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir. 3621  $\text{cm}^{-1}$ 'deki en belirgin pikin ise Si-O(H)-Al grubuna ait olduğu bilinmektedir. 1627  $\text{cm}^{-1}$  dalga boylarında görülen pikin ise su moleküllerinin absorpsiyonundan kaynaklı H-O-H bağlarının bükülme hareketleri nedeniyle olduğu düşünülür. Şiddeti en yüksek olan 1020  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda açığa çıkan pikin ise  $\text{TO}_4$  (T: Si ve Al) tetrahedra moleküllerine ait T-O-T asimetrik uzama vibrasyon hareketleri sonucu oluştuğu söylenebilir. 600-700  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında yer alan piklerden 787  $\text{cm}^{-1}$  ve 600  $\text{cm}^{-1}$  'deki pikler tetrahedraların sırasıyla O-T-O simetrik uzama ve çift halka titreşim hareketlerine atfedilmiştir (Rodríguez-Fuentes ve ark. 1998; Shumskaya ve ark. 1999; Garcia-Basabe ve ark. 2010; Mansouri ve ark. 2013; Iqbal ve ark. 2014; Puzka ve ark. 2023).

Şekil 4.2’de 1D (saf HA), 2D (%5 CLP + HA), 3D (%10 CLP + HA), 4D (%20 CLP + HA) numunelerine ait ATR grafiği verilmiştir. Sonuçlara göre saf hidroksiapatit daha kristalin yapıda olmasına rağmen %5, %10 ve %20 CLP katkısı kristalin yapıyı çok fazla etkilememiştir. Bütün numunelerde HA fazı korunmuştur.



Şekil 4.2. 1D (saf HA), 2D (%5 CLP + HA), 3D (%10 CLP + HA), 4D (%20 CLP + HA) numunelerine ait ATR analiz spektrumları

Şekil 4.3.’te eşit CLP konsantrasyonlarının farklı sıcaklıklarda sinterlenme grafiği görülmektedir. Sonuçlara göre bütün CLP konsantrasyonları için 800 °C ve 950 °C sıcaklık değerlerinde daha kristalin bir yapı elde edildiği görülmektedir. 1100 °C’de sinterlenmiş numunenin spektrumundaki pik yoğunluklarının önemli ölçüde azalması, daha amorf bir yapının oluştuğunu gösterir ki bütün numuneler için bu durum söz konusudur.

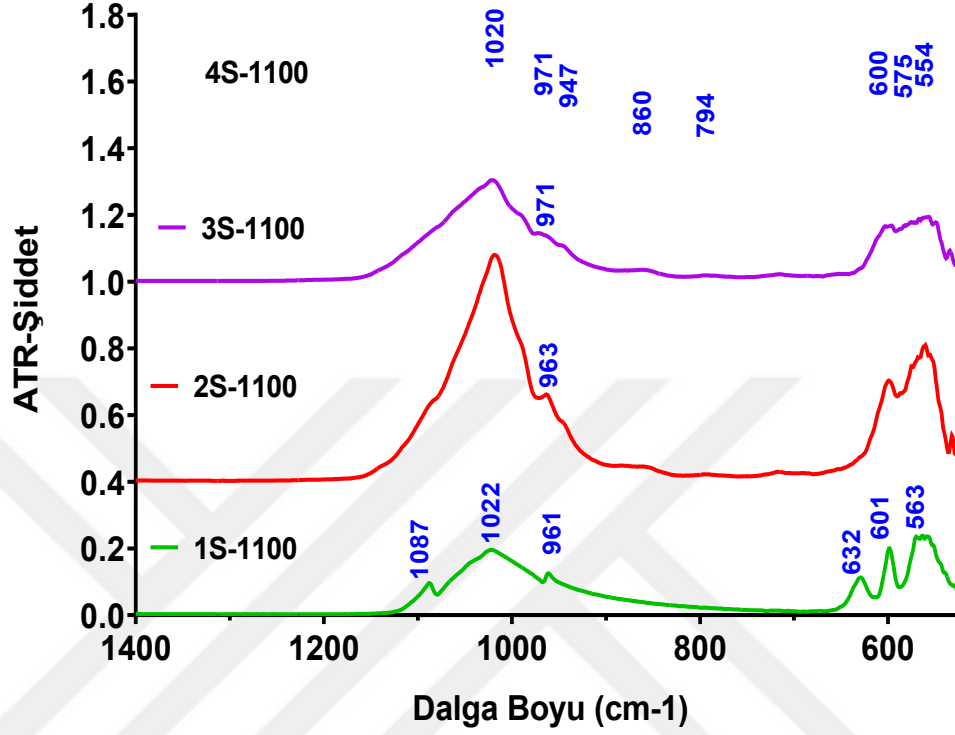


Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki CLP katkılı HA'nın farklı sıcaklıklarda sinterlenmesi grafiği a. Saf HA'nın 800, 950 ve 1100 °C'de sinterlenmesi, b. %5 CLP + HA'nın 800, 950 ve 1100 °C'de sinterlenmesi, c. %10 CLP + HA'nın 800, 950 ve 1100 °C'de sinterlenmesi, d. %20 CLP + HA'nın 800, 950 ve 1100 °C'de sinterlenmesi

Şekil 4.4.'te farklı konsantrasyonlardaki CLP katkılı HA'nın 1100 °C'de sinterlenmesi grafiği verilmiştir. Sonuçlara göre saf HA numunesi 1100 °C'de (1S-1100) tek fazda kalmaya devam etmiştir. Minimum miktardaki CLP (%5) katkılı HA (2S-1100), en yüksek pik şiddetine sahip olması sebebiyle daha fazla kristal yapı sergilediği ortaya çıkmaktadır. CLP konsantrasyonu arttıkça 1087  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pikler  $\nu_3$  titreşimlerini yavaş yavaş ortadan kaldırmaktadır. 2S-1100 numunesindeki 961  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik, hidroksiapatitin karakteristik  $\text{PO}_4^{3-}$   $\nu_1$  gerilme hareketlerine ait olup daha yüksek CLP konsantrasyonlarına sahip numunelerin (3S-1100 ve 4S-1100) spektrumlarında bu pik görülmemektedir. Bunun yerine, 971  $\text{cm}^{-1}$  ve 947  $\text{cm}^{-1}$ 'de



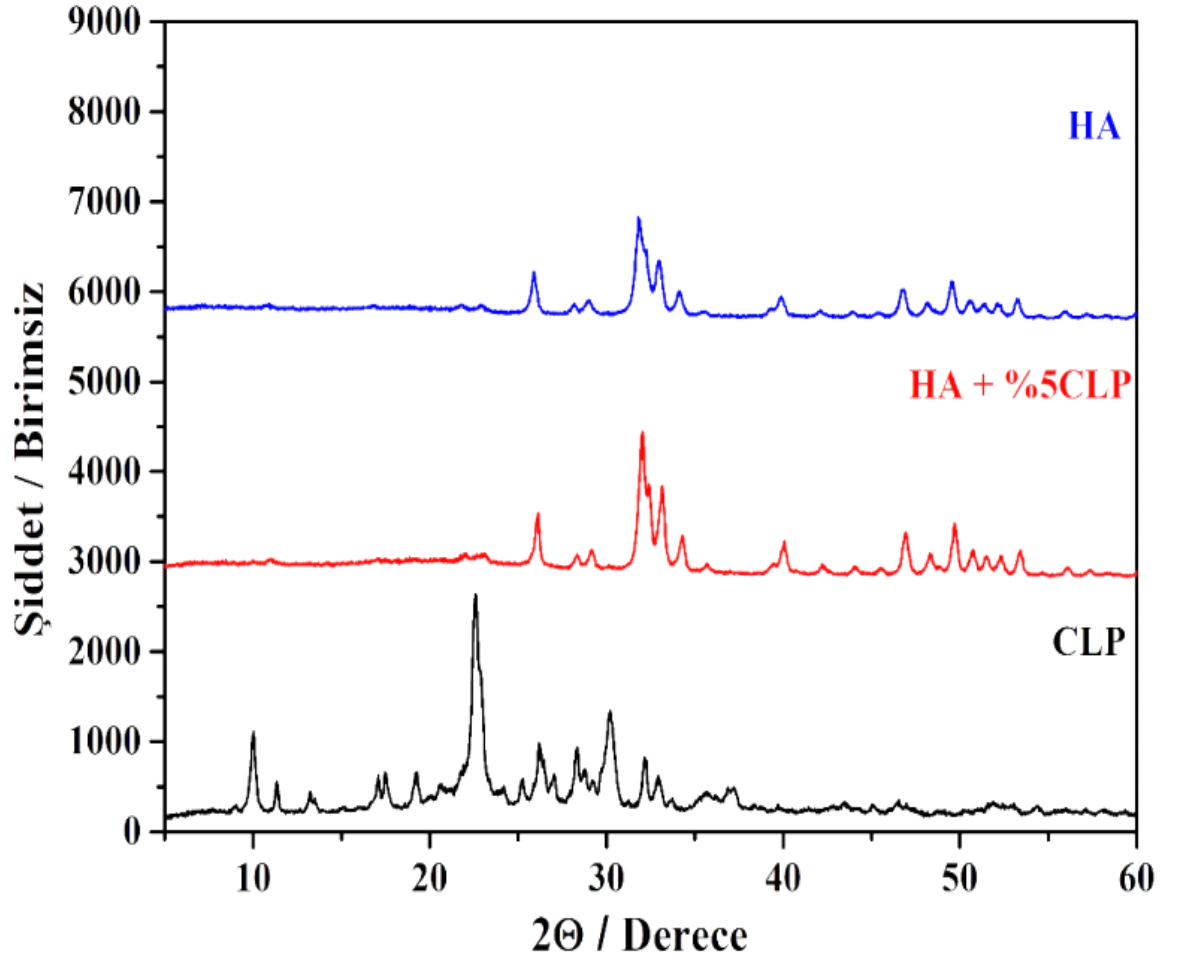
bulunan  $\beta$ -TCP faz piklerinin ikamelerinden oluşmaktadır (Rehman ve Bonfield 1997; Berzina-Cimdina ve Borodajenko 2012; Koçak 2021).



Şekil 4.4. Saf HA, %5 CLP + HA, %10 CLP + HA ve %20 CLP + HA numunelerinin 1100 °C’de siterlenmesi grafiği

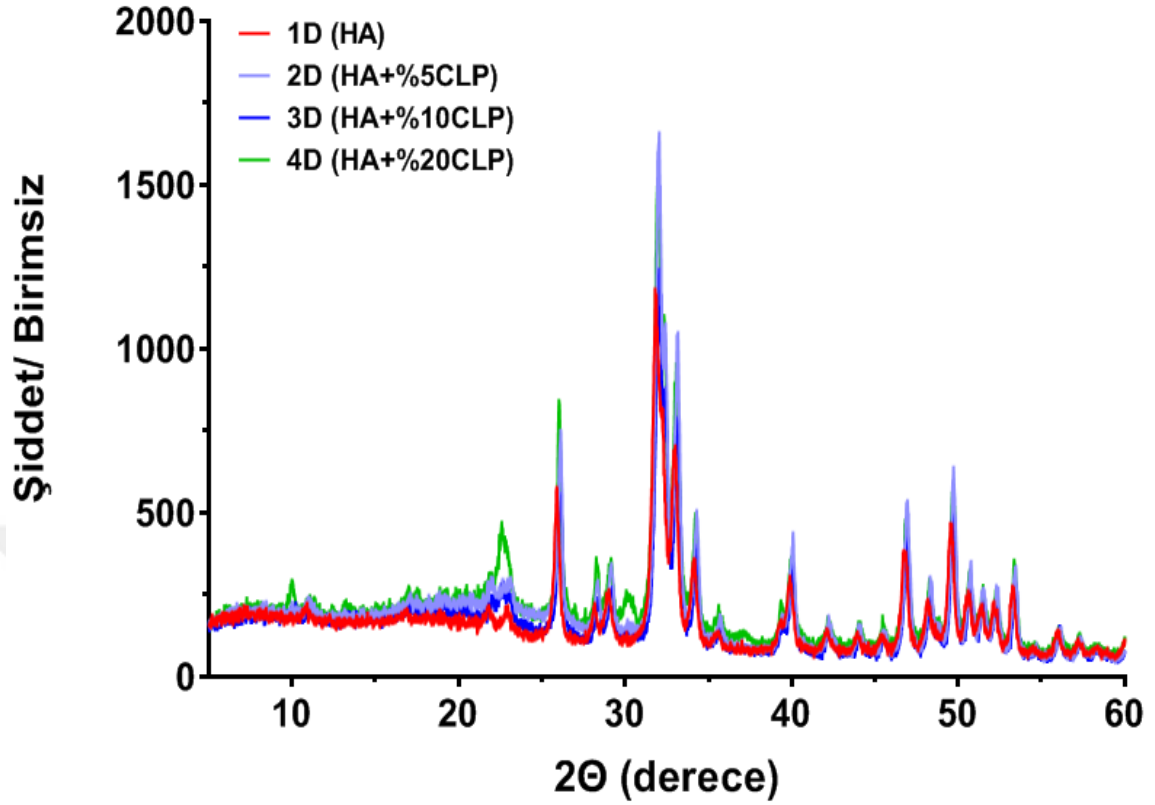
#### 4.2.1.2. XRD analizi

X-ışını difraksiyon tekniği ile CLP, HA+%5CLP ve HA numunelerinin kristal yapıları incelenmiş ve X-ışını kırınım desenleri Şekil 4.5.’te verilmiştir. Saf HA’ye ait  $2\theta$  değerleri, ICDD kristolografı veri tabanında bulunan 01-072-1243 numaralı PDF kartı ile örtüşmektedir. Grafiğe göre en şiddetli HA piki  $2\theta = 31.82^\circ$  iken ona yakın olan diğer şiddetli HA pikleri sırasıyla  $32.95^\circ$ ,  $32.19^\circ$ ,  $25.88^\circ$ ,  $34.11^\circ$ ,  $22.89^\circ$  ve  $34.11^\circ$  değerlerindedir. XRD grafiğinde en yüksek  $2\theta$  pik şiddeti CLP mineraline aittir. Bu da gösteriyor ki en yüksek kristalin yapı saf CLP’ye aittir.  $2\theta = 9.98^\circ$ ,  $11.35^\circ$ ,  $17.47^\circ$ ,  $22.49^\circ$ ,  $22.60^\circ$  ve  $30.18^\circ$  bölgelerinde şiddetli pikler ICDD veri tabanındaki referans numarası 00-039-1383’e göre klinoptilolit piklerine aittir. X-ışını kırınım grafiğine bakıldığında %5 CLP katkılı hidroksiapatit numunesinin saf HA’ye göre daha kristalin yapıda olduğu anlaşılmaktadır (Galletti ve ark. 2021; Dosa ve ark. 2022).



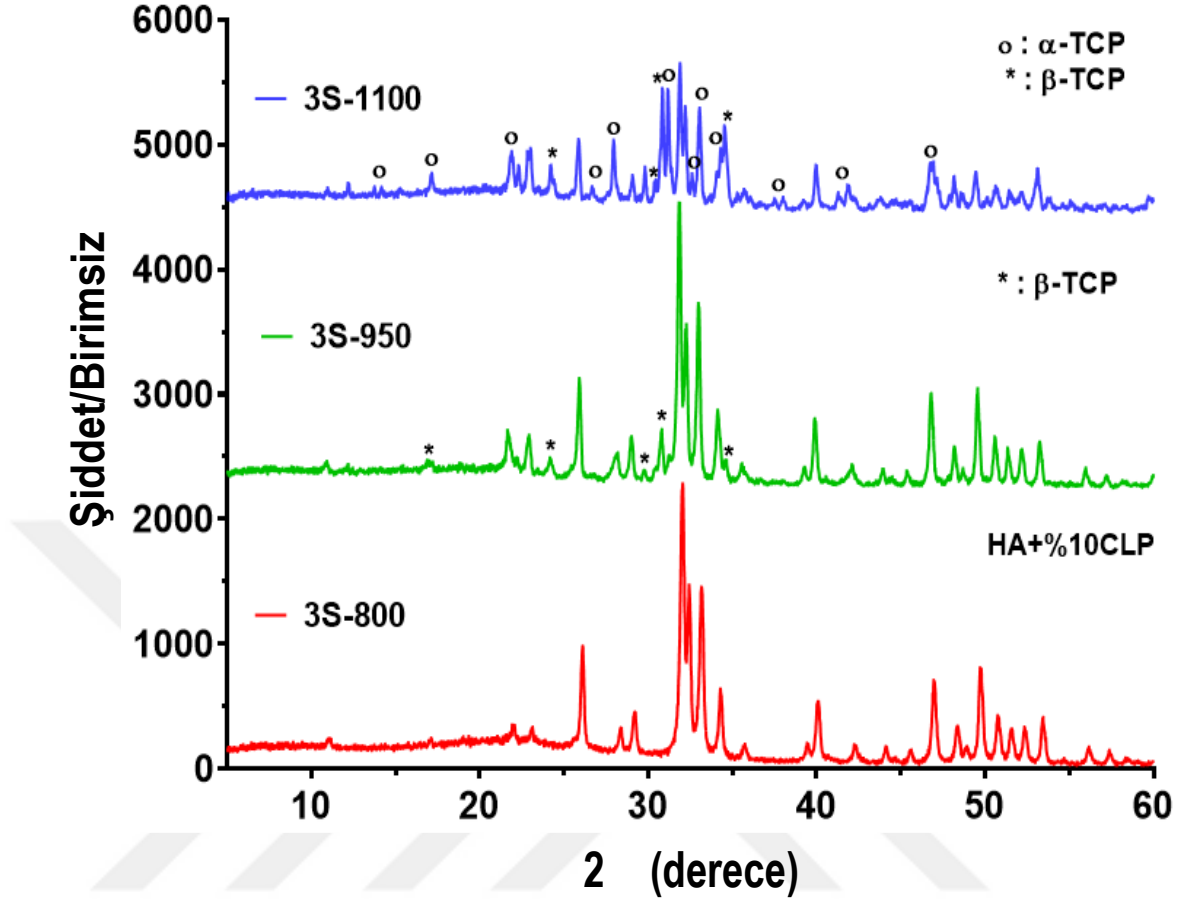
Şekil 4.5. Saf HA, saf CLP ve %5 CLP + HA XRD grafiği

Şekil 4.6'da saf HA ve %5 CLP (2D), %10 CLP (3D) ve %20 CLP (4D) katkılı HA'nın XRD grafiği görülmektedir. Grafiğe bakıldığında saf HA'ya CLP eklendiğinde kristalin yapının arttığı ve CLP konsantrasyonu ile kristalin yapının doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Saf HA ve %5 CLP(2D), %10 CLP(3D) ve %20 CLP(4D) katkılı HA'nın XRD grafiği

Şekil 4.7'de HA + %10 CLP numunesinin farklı sıcaklıklarda (800 °C, 950 °C ve 1100 °C) sinterlenmesi XRD grafiği görülmektedir. HA'nın XRD desenleri, kristalliğin sıcaklıkla artması nedeniyle tüm sinterleme sıcaklıklarında saf HA fazında stabil olduğu görülmektedir. Fakat %10 ve üzeri CLP konsantrasyonlarında HA'nın stabilitesi azalmış ve 950 °C ve 1100 °C sıcaklıklarında  $\alpha$  ve  $\beta$ -TCP HA oluşumu meydana gelmiştir. 800 °C'de sinterlenmiş olan %10 CLP katkılı numunenin (3S-800) XRD spektrumu, saf HA fazı ile eşleşen XRD desenine sahiptir. Fakat 3S-950 örneğinde 800-1100 arasında olduğu bildirilen  $\beta$ -TCP fazıyla eşleşen 16.9°, 29.6°, 31.2° ve 34.4° civarında  $2\theta$  değerlerinde ek pikler oluşmuştur. 1100 °C'de sinterleme işlemi sonrasında, kristalin yapı yerine daha amorf bir yapı meydana gelmiştir (Galletti ve ark. 2021; Dosa ve ark. 2022).



Şekil 4.7. HA + %10 CLP numunesinin farklı sıcaklıklarda (800 °C, 950 °C ve 1100 °C) sinterlenmesi ile elde edilen numunelere ait XRD grafiklerinin karşılaştırılması

#### 4.2.1.3. XRF analizi

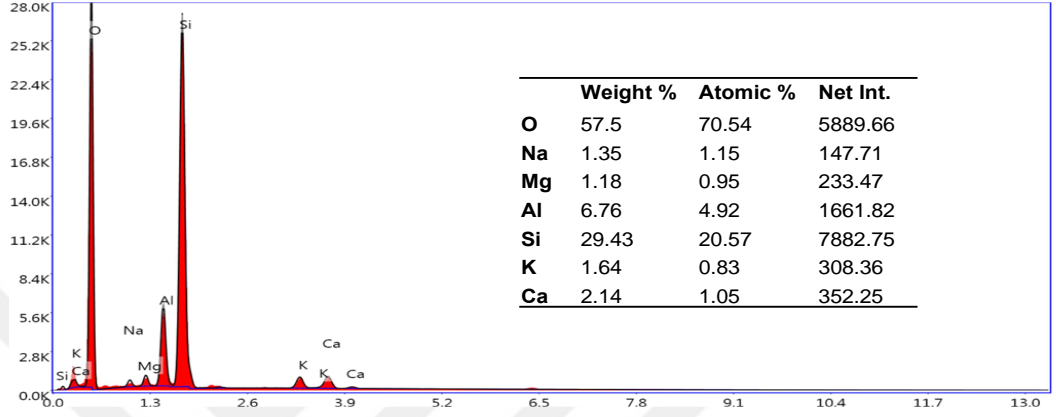
Doğal CLP mineralinin XRF analizleri element oksit yüzdeleri açısından incelenmiştir (Tablo 4.1). Elde edilen sonuçlara göre, CLP'nin yapısında yaklaşık %69 oranında  $\text{SiO}_2$  ve %12 oranında  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ve geri kalan kısmında ise Ca, K, Mg ve Fe gibi element oksitlerini içerdiği görülmektedir.

**Tablo 4.1.** Doğal CLP numunesine (Rota Madencilik, Gördes, Manisa) ait XRF analiz sonuçları

$\text{SiO}_2$	$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{K}_2\text{O}$	$\text{CaO}$	$\text{MgO}$	$\text{Na}_2\text{O}$	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	$\text{BaO}$	$\text{SrO}$	$\text{SO}_3$	$\text{P}_2\text{O}_5$	$\text{Mn}_3\text{O}_4$	$\text{TiO}_2$	Diğer	LOI
68.72	11.86	2.24	3.43	1.09	0.41	1.45	0.08	0.06	0.05	0.05	0.04	0.02	0.03	10.47

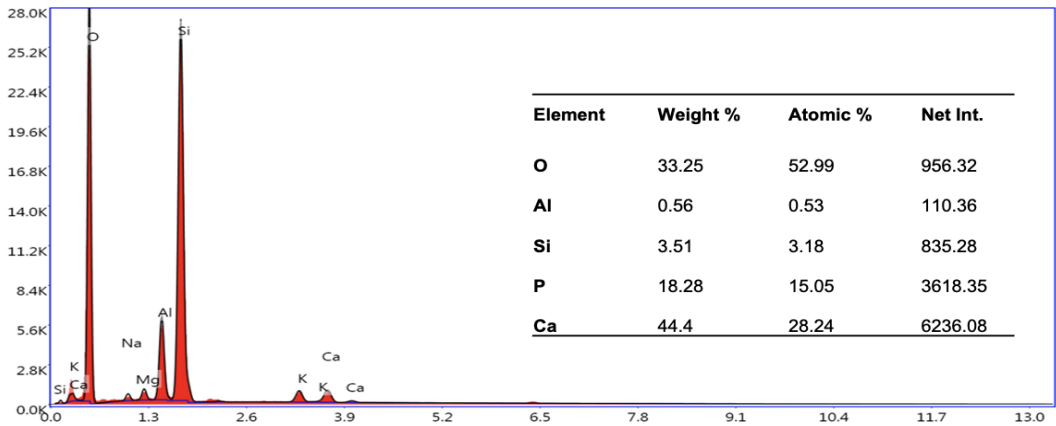
#### 4.2.1.4. EDX analizi

Şekil 4.8’ de CLP numunesinin EDX analiz sonuçları görülmektedir. Buna göre CLP’nin yapısında %20,6 Si, %4,9 Al (Si/Al oranı 4,2), yaklaşık %1 Na ve Ca ve Mg ve K (<%1) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. CLP numunesinin EDX analizi

Şekil 4.9’da 800 °C’de (3S-800) sinterlenmiş %10 CLP katkılı HA numunesinin EDX analizi ve element haritalaması gösterilmektedir. CLP çözünmediği için CLP’yi oluşturan elementler HA’nın yapısında belirli bölgelerde küme halinde birikmiştir. EDX element analizine göre Ca/P oranı da 1,57 olarak belirlenmiştir. Bu durumun, hidroksiapatitin stabilitesinin azaltılmasına ve biyoemilebilirliğinin arttırılmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Mansouri ve ark. 2013; Zhan ve ark. 2013; Schiavo ve ark. 2023).



Şekil 4.9. 800 °C’de (3S-800) sinterlenmiş %10 CLP katkılı HA numunesinin EDX analizi

#### 4.2.2. Morfolojik ve yapısal analizler

Bu çalışma kapsamında hazırlanan numuneler için BET, SEM, S-TEM analizleri yapılarak sonuçlar incelenmiştir.

##### 4.2.2.1. BET analizi

Yapılan analizlerden çıkan sonuçlara göre, HA ve HA + %5 CLP numunelerine ait BET yüzey alanları sırasıyla 47.68 ve 21.9 m<sup>2</sup>/g olarak ölçülmüştür. Ek olarak, BJH (Barrett-Joyner-Halenda) yöntemiyle aynı numunelerin gözenek çaplarının sırasıyla 30.58 ve 4.7 nm olarak ölçüldüğü gözlenmiştir. Bu yöntemle belirlenen adsorpsiyon ve desorpsiyon gözenek boyutlarında da görülmektedir. Ölçülen bütün numunelerin gözenek boyutu 4-31 nm aralığındadır. HA ve %5 CLP katkılı HA'ın ölçülmüş olan BET sonuçları karşılaştırıldığında CLP katkısının, yüzey alanını ve gözenek boyutunu düşürdüğü Tablo 4.2'de görülmektedir. Ayrıca HA ve CLP katkılı HA için bir diğer karşılaştırma sonucu da katkılı olan numunede CLP kristallerinin var olan gözeneklerinin bir miktar kapandığı üzerinedir (Watanabe ve ark. 2006; Mansouri ve ark. 2013).

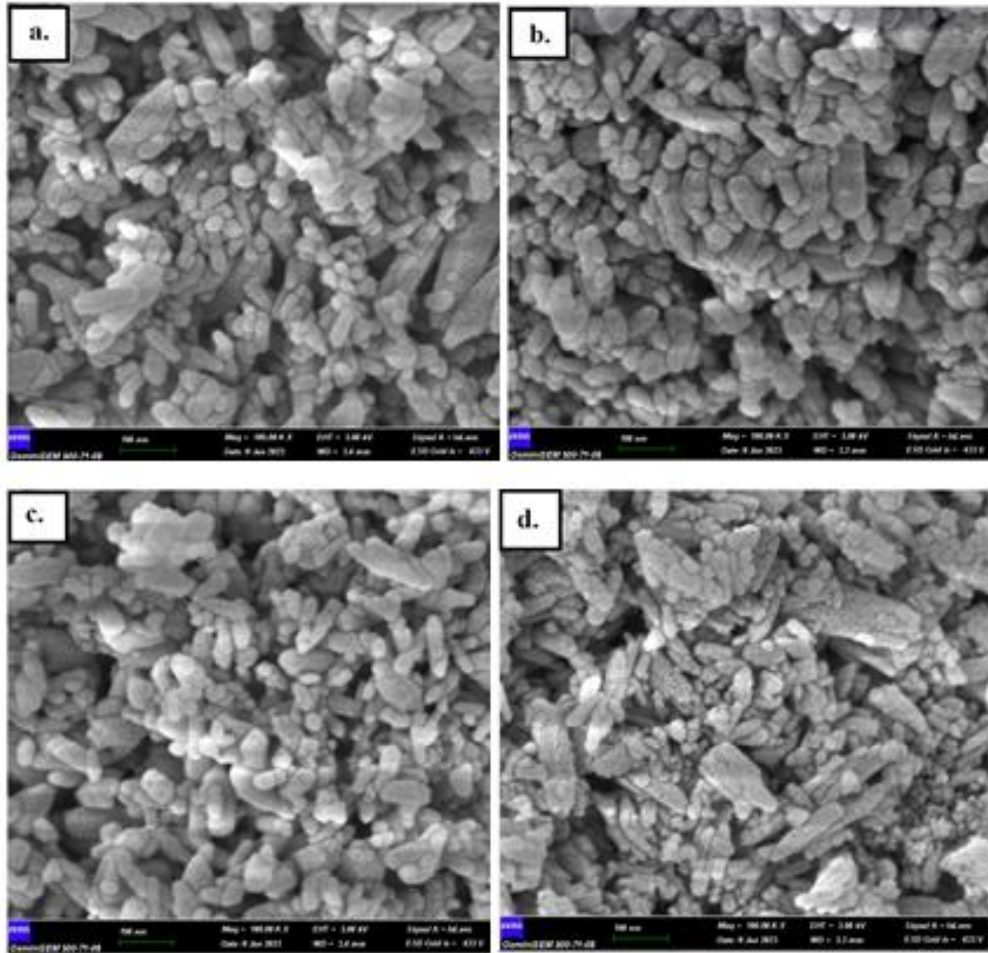
Tablo 4.2. HA(1D) ve HA + %5 CLP (2D) numunelerine ait BET sonuçları tablosu

Parametre	Sonuçlar	
	1D	2D
P/Po = 0,35 (m <sup>2</sup> /g) 'te tek nokta yüzey alanı	47.47	22.36
BET Yüzey Alanı	47.68	21.91
BJH Adsorpsiyon ortalama gözenek genişliği (Å)	305.89	47.01
BJH Adsorpsiyon ortalama gözenek genişliği (Å)	301.55	48.98

##### 4.2.2.2. SEM ve S-TEM analizi

HA ve HA + %5 CLP, HA + %10 CLP ve HA + %20 CLP SEM numunelerine ait SEM analizi görüntüleri Şekil 4.10'da verilmektedir. Şekilde (b) görüldüğü gibi saf HA ve HA + %5 CLP katkılı HA numuneleri benzer, çubuksu ve porozif toz yapıdadır. Partikül boyut dağılımı çok homojen değildir. Fakat Image-J programı yardımıyla belirlenen partikül boyut ölçümlerine göre saf HA ve HA + %5 CLP tozlarının ortalama tane boyutu 58,36 nm ve 51,36 nm olarak hesaplanmıştır. CLP katkısı yapılarak üretilen HA tozunun boyutunun azaldığı anlaşılmaktadır. Fakat bu azalma önemli ölçüde bir

azalma değildir. Singh ve arkadaşlarının çalışmasına göre silikat bazlı biyomalzemelerin eklendiği malzemenin partikül boyutunu azaltıcı etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca saf HA ve HA + %5, %10 ve %20 CLP numunelerinin yapısına baktığımızda içeriğinde küçük mesafeye sahip belirli bir şekle benzemeyen yapıda birçok gözeneklerin var olduğu görülmektedir. HA'nın gözenekli yapısı biyomedikal mühendisliği uygulamalarında önemli bir yer tutmaktadır. Çünkü bu porozif yapı hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını kolaylaştırmaktadır. BET analiz sonuçlarında da görüldüğü üzere %5 CLP katkısı HA'nın porozite miktarında bir miktar azalmaya neden olmuştur. CLP eklendiğinde parçacıklar arasındaki boş alan miktarı azalmıştır (Singh ve ark. 2021).

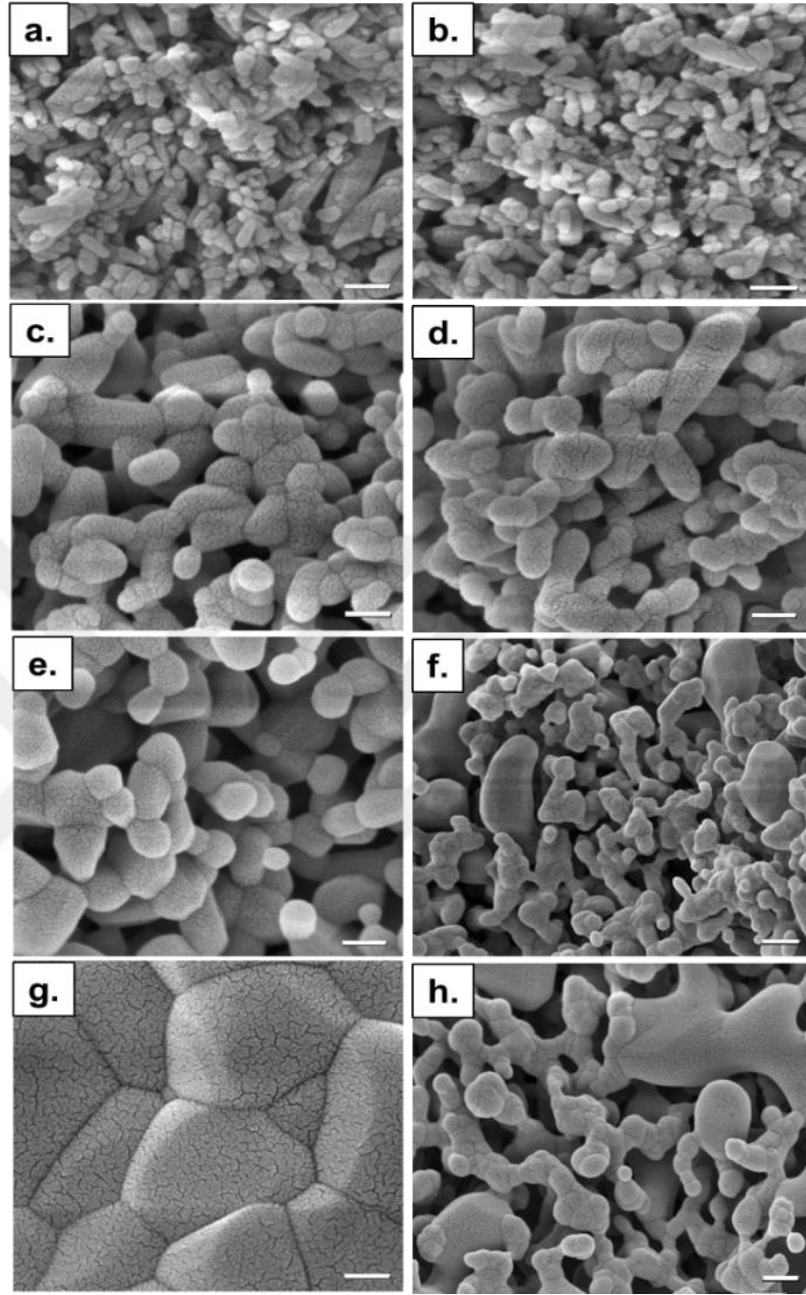


Şekil 4.10. SEM analiz görüntüsü a. HA SEM analiz sonucu, b. HA + %5 CLP SEM analiz sonucu c. HA + %10 CLP SEM analiz sonucu, d. HA + %20 CLP SEM analiz sonucu (Tüm görüntülerde ölçek çubuklarının uzunlukları 100 nm'dir.)

100 °C'de kurutulan ve 800 °C, 950 °C ve 1100 °C'de sinterlenen 1 (saf HA) ve 3 (HA+%10CLP) numunelerin SEM görüntüleri Şekil 4.11'de verilmiştir. 100 °C'de kurutulan 3D ile 1D tozları karşılaştırıldığında (Şekil 4.11.a ve 4.11.b), parçacık boyutlarının benzer olduğu ve 3D numunesinin 1D'ye göre daha fazla topaklanmış parçacıklara sahip olduğu görülmektedir. Saf HA tozlarının 800 °C ve 950 °C'de sinterlenmesi sonucu tane boyutları artmasına rağmen saf HA tozları hala başlangıç toz yapısını korumuş ve camsı faz oluşumu gözlenmemiştir. 950 °C'de sinterleme sonrasında 3S numune tozlarının tane boyutu artmış ve camsı faz oluşumu gözlemlenmeye başlamıştır.

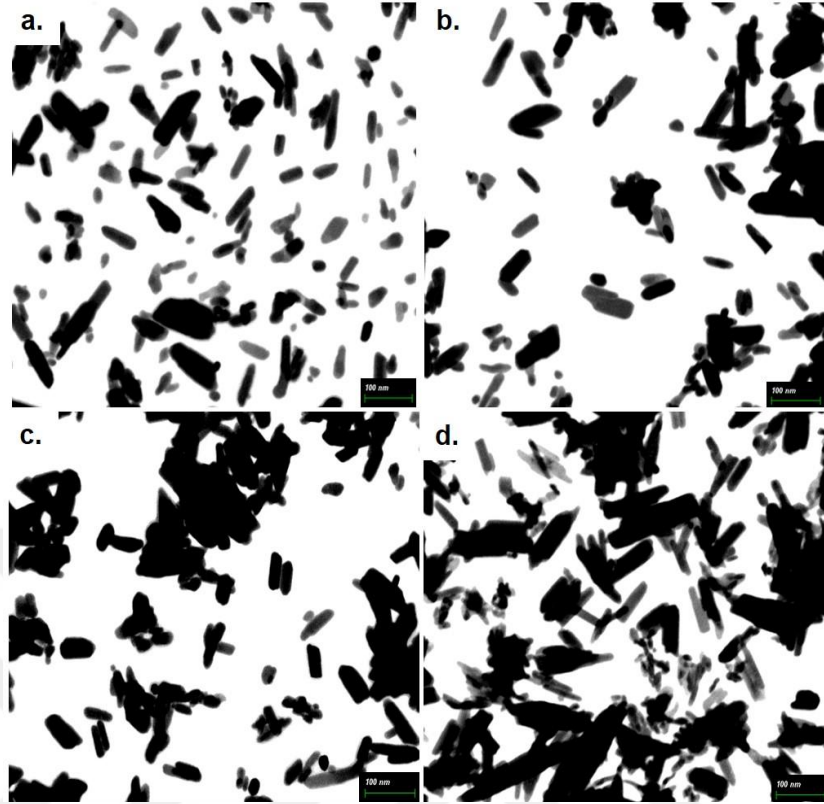
1100 °C'de sinterleme sonrasında, 3S numunesinin camsı faz taneleri birleşmiştir ve bu da büyük tanelerin oluşmasına neden olmuştur. Bununla birlikte gözenekli ve birbirine bağlı morfoloji hala korunmuştur. Aksine, saf HA tozunun 1100 °C'de sinterlenmesinden sonra gözeneksiz, yüksek yoğunluklu kompakt bir yapı oluşmuştur, camsı faz içermemektedir. Sonuçlar, CLP'nin birbirine bağlı gözenekli morfolojiyi 1100 °C gibi yüksek sıcaklıklara kadar korumada olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir ((Iqbal ve ark. 2014).





Şekil 4.11. Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş, saf HA(sağ taraf) ve %10 CLP katkılı HA(sol taraf) parçacıklarının SEM mikrografları: a-b. 100 °C-24 saat, c-d. 800 °C-3 saat, e-f. 950 °C-3 saat, c-d. 1100 °C-3 saat. Ölçek çubuklarının uzunlukları f ve h (300 nm) dışındaki tüm görüntülerde 100 nm'dir.

1D (saf HA), 2D (HA+%5 CLP), 3D (HA+%10 CLP) ve 4D (HA+%20 CLP) numunelerin morfolojilerini gösteren S-TEM görüntüleri Şekil 4.12'de verilmiştir. Saf HA tozlarının S-TEM görüntüsünde çoğunlukla çubuk benzeri şekillere sahip kümeler olduğu görülmektedir (Şekil 4.12.a).



Şekil 4.12. S-TEM analiz görüntüsü a. HA(1D) S-TEM analiz sonucu, b. HA + %5 CLP(2D) S-TEM analiz sonucu c. HA + %10 CLP(3D) S-TEM analiz sonucu, d. HA + %20 CLP(4D) S-TEM analiz sonucu (Tüm görüntülerde ölçek çubuklarının uzunlukları 100 nm'dir.)

#### 4.2.3. Termal analizler

Bu çalışma kapsamında hazırlanan numuneler için TG ve DTA analizleri yapılarak sonuçlar incelenmiştir.

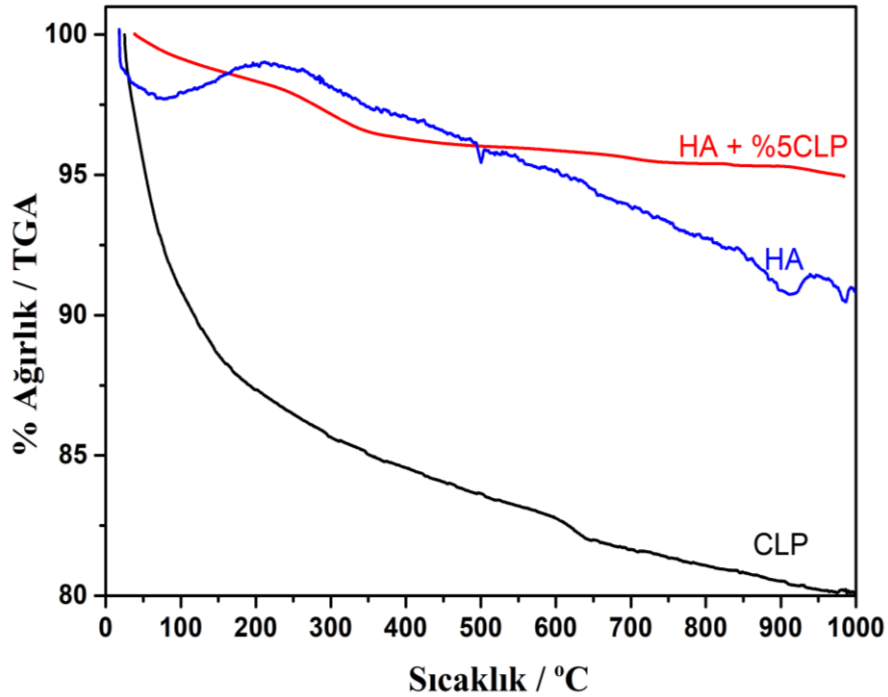
##### 4.2.3.1. TG/DTA analizleri

Bu çalışma kapsamında hazırlanan numuneler için TG ve DTA analizleri yapılarak sonuçlar incelenmiştir.

Kütle ve sıcaklık değişimi baz alınarak yapılan HA, HA +%5 CLP ve CLP numunelerine ait TGA eğrileri Şekil 4.13'te verilmiştir. CLP numunesine ait TGA eğrisine bakıldığında 200°C' ye kadar %12 civarında gerçekleşen ağırlık kaybının fiziksel absorblanmış suyun uzaklaşmasından, 200-646°C sıcaklıkları arasında meydana gelen %6 kadar ağırlık kaybının ise molekül suyunun uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Erdoğan ve ark. 2008). Zeolit yapısındaki su 'zeolitik su' olarak

adlandırılmıştır ve klinoptilolit için zeolitik suyun yaklaşık olarak 600°C'ye kadar uzaklaştırıldığı bildirilmektedir (Petkova ve ark. 2011). Zeolitik suyun yapıdan uzaklaşmasının ardından toplam ağırlık kaybı %18 olarak belirlenmiştir. TGA analizinde CLP'de meydana gelen toplam ağırlık kaybı ise %20.03'dür. HA'da ise 80°C sıcaklığına kadar %3 civarında bir ağırlık kaybı meydana gelmiştir. Fakat 80-350°C arasında gerçekleşen az miktardaki ağırlık artışının gaz akışından kaynaklandığı düşünülmektedir. 350-842°C sıcaklık aralığında %4,6'lık ağırlık kaybı meydana gelirken 842-915°C arasında %1,6'lık hızlı bir ağırlık kaybı meydana gelmiştir. Sıcaklık değişimine bağlı olarak toplam ağırlık kaybı %9,14 olarak belirlenmiştir.

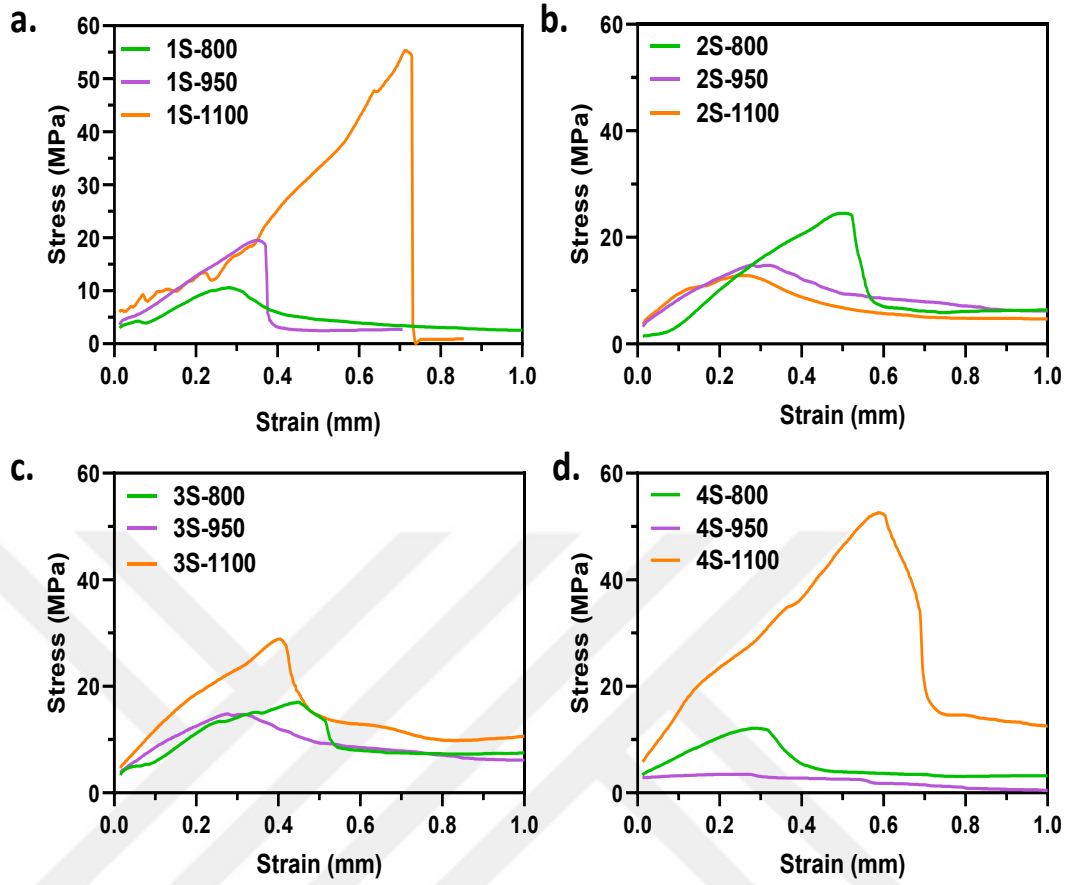
%5 CLP katkılı HA toz numunesinin TGA eğrisinde 133°C'ye kadarki %1,2 ağırlık düşüşünün yüzey suyunun uzaklaşmasından, 133-343°C arasındaki %2,2'lik ağırlık düşüşünün ise molekül suyunun uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Grafiğin geri kalanında sıcaklığa bağlı ağırlık kaybı yok denecek kadar azdır. Toplam ağırlık kaybı ise %5,03 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında %5 CLP katkılı HA'nın saf HA'ya kıyasla termal kararlılığının daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.13. Saf HA, HA+%5CLP ve CLP numunelerinin TGA/DTA eğrileri.

#### 4.2.4. Mekanik basma testi

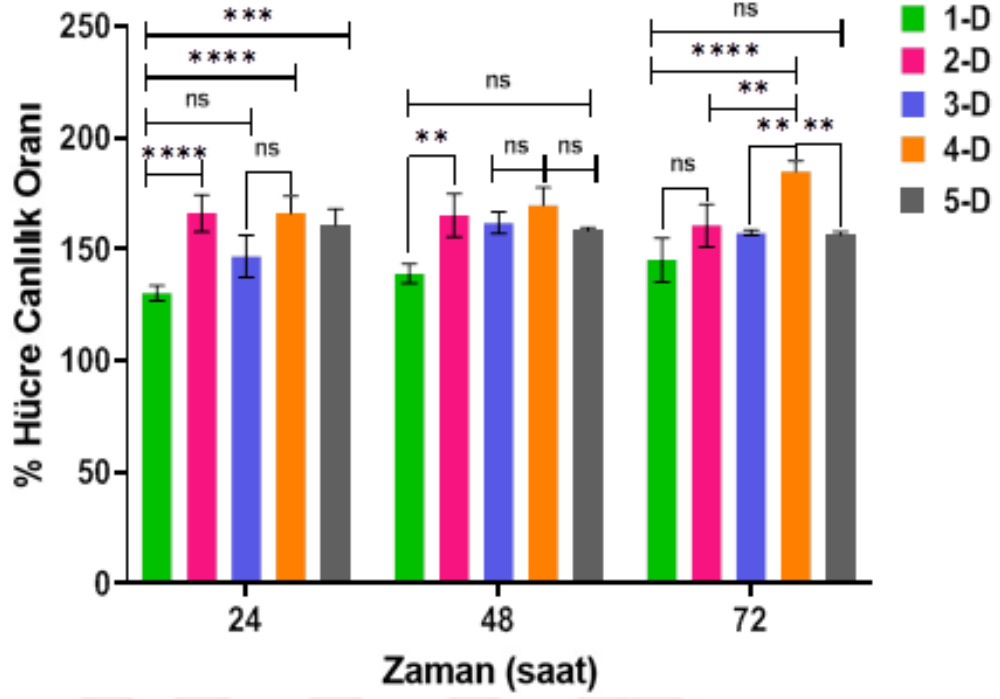
Numuneler için mekanik analizler basma testi ile yapılmıştır. Farklı sıcaklıklarda sinterlenen farklı konsantrasyonlardaki numuneler için gerilme-gerinim eğrileri Şekil 4.14'te verilmiştir. A grafiğine bakıldığında sinterleme sıcaklığı ile saf HA numunesinin basınç dayanımının doğru orantılı olduğu görülmektedir. Bu numune 1100 °C'de sinterleme sonrasında 0,74 mm şekil değiştirmede 55 MPa civarına ulaşmıştır. B grafiğine bakıldığında 2S(HA + %5 CLP) için en yüksek basınç dayanımının 800 °C'de sinterlenen numunede olduğu görülmüştür. Ek olarak 800 °C'de sinterlenen numuneler arasında en yüksek basınç mukavemeti 2S-800'e, 950 °C'de sinterlenen numuneler arasında en yüksek basınç mukavemeti saf HA'ye, 1100 °C'de sinterlenen numuneler arasında en yüksek basınç mukavemeti ise 4S-1100 numunesine aittir. C (HA + %10 CLP) ve D (ve HA + %20 CLP) grafiği için en yüksek basınç dayanımının olduğu sinterleme sıcaklığı 1100°C'dir. HA + % 20 CLP miktarına sahip 4S numunesi 950 °C'de en düşük basınç dayanımına sahipken, 1100°C'de sinterlendiğinde 0,6 mm gerinimde maksimum değer olan 52,6 MPa'ya ulaşmıştır. Genel olarak tüm örneklerin basınç dayanımı trabeküler kemik (0,1-16 MPa) ile kortikal kemik (130-200 MPa) arasında basınç dayanımı değer aralığındadır.



Şekil 4.14. Mekanik basma test grafiği a. Saf HA farklı sinterleme sıcaklıklarına ait basma testi grafiği, b. 2S (HA+ %5 CLP) farklı sinterleme sıcaklıklarının ait basma testi grafiği, c. 3S (HA+ %10 CLP) farklı sinterleme sıcaklıklarının ait basma testi grafiği, d. 4S (HA+ %20 CLP) farklı sinterleme sıcaklıklarının ait basma testi grafiği

#### 4.2.5. Biyouyumluluk ve sitotoksite testi

24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman diliminde gerçekleştirilmiş olan sitotoksite testlerine ait sonuçlar Şekil 4.15'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında negatif kontrole kıyasla hücre ekili olan tüm numunelerin gerçekleştirilmiş olan bütün zaman dilimlerinde yüzde canlılık oranlarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. 24 saat sonrasındaki test sonuçlarına göre HA + %5 CLP (2D) numunesinin saf HA (1D) numunesine göre biyouyumluluğunun daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p < 0,0001$ ). HA + %5 CLP ile CLP numuneleri canlılık oranları arasında belirgin fark bulunmamaktadır. Fakat CLP numunesinin biyouyumluluğu HA'ya göre daha yüksek çıkmıştır. Tüm numuneler arasında en yüksek CLP miktarına sahip 4D numunenin tüm zaman aralıklarında en biyouyumlu olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.15. Saf HA (1D), saf CLP (5D) ve HA+%5 CLP (2D), HA+%10 CLP (3D) ve HA+%20 CLP (4D) numunelerine ait % Hücre Canlılık Oranları ve standart sapma miktarlarını gösteren grafik. İstatistiki analiz GraphPad Prism programında 2-Way ANOVA yöntemiyle TUKEY testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ( $\alpha$ :0,005 ve 0,1234(ns), 0,0332 (\*), 0,0021 (\*\*), <0,0001 (\*\*\*\*))

HA için 48 saat olarak uygulanan test ile HA'in biyoyumluluğu 24 saat olarak uygulanan test karşılaştırıldığında sürenin artmasıyla biyoyumluluğun da arttığı görülmüştür. Hücre kültüründe 72 saatlik testlerde 48 saate kıyasla hücre canlılık yüzdesi HA numunesinde artarken değer olarak daha yüksek canlılığa sahip olan CLP ve HA + %5 CLP (2D) numunelerinde hafif bir duraklama ve azalış gözlenmiştir. Bu düşüşün, 72 saatlik kültür süresinin uzunluğundan kaynaklı besin yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

## 5. BÖLÜM

### TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

SEM ve S-TEM ile yapılan morfolojik karakterizasyonlara bakıldığında, nano boyutlu çubuksu biyomimetik partiküller elde edilmiştir. İnce tabakalar halinde bulunan geniş CLP partikülleri üzerine ince HA partikülleri yapılmış formda yer almaktadır. CLP katkılı HA numuneleri, 950°C ve 1100°C'de camsı yapıda ve birbirine bağlı porozif bir mikro yapıya sahiptir. XRD sonuçlarına göre CLP katkılı numuneler için 800 °C ve 950 °C sıcaklık değerlerinde daha kristalin bir yapıda iken 1100 °C'de sinterlenmiş numunenin daha amorf bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. HA daha kristalin yapıda olmasına rağmen %5, %10 ve %20 CLP katkısı kristalin yapıyı çok fazla etkilemediği ve birbirine bağlı gözenekli morfolojilerinin korunduğu görülmüştür. Bununla birlikte, FT-IR ve XRD analiz sonuçları, CLP katkılı numunelerde 950 °C'de  $\beta$ -TCP fazının oluşumuna ve 1100 °C'de  $\alpha$ -TCP faz dönüşümüne yol açan termal kararlılığın azaldığını göstermektedir. Biyouyumluluk ve sitotoksisite testleri, tüm CLP katkılarının hücre canlılığını olumlu yönde etkilediğini ve en yüksek orandaki CLP katkısının en yüksek hücre canlılık oranına yol açtığını göstermektedir. Genel olarak, bu sonuçlar, çeşitli iyonları barındıran CLP mineralinin, HA ve CLP arasındaki iyonik etkileşimler yoluyla apatitin kristal yapısını etkilediğini göstermektedir. Saf HA ve CLP katkılı HA'nın ölçülmüş olan BET sonuçları karşılaştırıldığında CLP katkısının, yüzey alanını ve gözenek boyutunu düşürdüğü görülmüştür. EDX element analizine göre Ca/P oranı da 1,57 olarak belirlenmiştir. Bu durumun, hidroksiapatitin stabilitesinin azaltılmasına ve biyoemilebilirliğinin artırılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir Buna bağlı olarak biyorezorpsiyon, hücrel etkileşimler ve osteointegrasyon süreçlerinin indükleneyeceği düşünülmektedir. Genel olarak tüm örneklerin basınç dayanımı trabeküler kemik ve kortikal kemi basınç dayanımı değer aralığında olmasına rağmen en yüksek CLP oranı ve en yüksek sinterleme sıcaklığında maximum mekanik dayanıma sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak CLP katkılı HA nanoseramiklerinin, yük taşımayan kemiklerin rejenerasyonunu desteklemede yüksek potansiyel sunacağı düşünüülerek gelecekte yapılacak *in-vivo* klinik çalışmalarla desteklenmesi amaçlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

Akça, S.G., "Doğal hidroksiapatit toz üretimi, karakterizasyonu ve antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi", *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.1-57, Sakarya, 2016.

Albrektsson, T., Johansson, C., "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration" *Eur Spine J.*, 10, s.96-101, 2001.

Alshemary, A.Z., Pazarçeviren, A.E., Keskin, D., Tezcaner, A., Hussain, R., Evis, Z., "Porous clinoptilolite—nano biphasic calcium phosphate scaffolds loaded with human dental pulp stem cells for load bearing orthopedic applications", *Biomedical Materials*, 14(5), s.055010, 2019.

Ambrozova, P., Kynicky, J., Urubek, T., Nguyen, V., "Synthesis and Modification of Clinoptilolite", *Molecules*, 22(7), s.1107, 2017.

Armbruster, T., Gunter, M.E., "Crystal Structures of Natural Zeolites", *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 45(1), s.1–67, 2001.

Auerkari, P., "Mechanical and physical properties of engineering alumina ceramics", *Mechanical and physical properties of engineering alumina ceramics*. Vol. 23. Espoo, Finland, 1996.

Bacakova, L., Vandrovцова, M., Kopova, I., Jirka, I., "Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review", *Biomaterials Science*, 4(1), s.96–103, 2016.

Bang, L.T., Long, B.D., Othman, R., "Carbonate Hydroxyapatite and Silicon-Substituted Carbonate Hydroxyapatite: Synthesis, Mechanical Properties, and Solubility Evaluations", *The Scientific World Journal*, s.1–9, 2014.

Cimdina, L.B., Borodajenko, N., "Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, 12(7), s.251-263, 2012.

Bogdanov, B., Georgiev, D., Angelova, K., Yaneva, K., "Natural zeolites: clinoptilolite", *Review, Natural & Mathematical science*, 4, s6-11, 2009.



Çakmak, S., "Kemik doku onarımı için hidroksiapatit peptit amfifil bazlı nanokompozit doku iskelelerinin geliştirilmesi", *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, s.4-27, Ankara, 2015.

Çankaya, N., Sökmen, Ö., "Biyopolimerler ve Montmorillonit Kil Nanokompozitleri", *Politeknik Dergisi*, 20(3), s.663-673, 2017.

Chifiriuc, M.C., Ficai, A., Grumezescu, A., Ditu L.M., Popa, M., "Soft tissue engineering and microbial infections", *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*, Elsevier, s.1–29, 2016.

Colella, C., "A critical reconsideration of biomedical and veterinary applications of natural zeolites", *Clay Minerals*, 46(2), s.295–309, 2011.

Davis, J.R., "Introduction", *Handbook of materials for medical devices*. Materials Park, USA, 2003.

De Aza, A.H., Chevalier, J., Fantozzi, G., Schehl, M., Torrecillas, R., "Crack growth resistance of alumina, zirconia and zirconia toughened alumina ceramics for joint prostheses", *Biomaterials*, 23(3), s.937–945, 2002.

De Lange, G.L., De Putter, C., De Wijs, F.L.J.A., "Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite-bone interface", *Journal of Biomedical Materials Research*, 24(7), s.829–845, 1990.

Demirkol, N., "Koyun hidroksiapatit esaslı kompozitlerin üretimi ve karakterizasyonu", *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, s.3-49, İstanbul, 2013.

Detsch, R., Mayr, H., Ziegler, G., "Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics", *Acta Biomaterialia*, 4(1), s.139–148, 2008.

Dosa, M. Grifasi, N., Galletti, C., Fino, D., Piumetti, M., "Natural Zeolite Clinoptilolite Application in Wastewater Treatment: Methylene Blue, Zinc and Cadmium Abatement Tests and Kinetic Studies", *Materials*, 15(22), s.8191, 2022.

Du, M., Chen, J., Liu, K., Xing, H., Song, C., "Recent advances in biomedical engineering of nano-hydroxyapatite including dentistry, cancer treatment and bone repair", *Composites Part B: Engineering*, 215, s.108790, 2021.

Edgar, L., McNamara, K., Wong, T., Tamburrini, R., Katari, R., Orlando, G., "Heterogeneity of Scaffold Biomaterials in Tissue Engineering", *Materials*, 9(5), s.332, 2016.

Elgit, H., "Biyomalzeme amaçlı polimerik nanokompozitlerin hazırlanması ve karakterizasyonu", *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.2-17, Balıkesir, 2016.

Erdoğan, B., Sakizci, M., Yörükoğulları, E., "Characterization and ethylene adsorption of natural and modified clinoptilolites". *Applied Surface Science*, 254(8), 2450–2457, 2008.

Evis, Z., "Çeşitli İyonlar Eklenmiş Nano- Hidroksiapatitler: Üretim Yöntemleri, İç Yapı, Mekanik ve Biyouyumluluk Özellikleri Yönlerinden İncelenmesi", *Uluslararası Mühendislik Araştırma ve Geliştirme Dergisi*, 3(1), s.55-65, 2011.

Faksawat, K., Limsuwan, P., Naemchanthara, K., "3D printing technique of specific bone shape based on raw clay using hydroxyapatite as an additive material", *Applied Clay Science*, 214, s.106269, 2021.

Galletti, C., Dosa, M., Russo, N., Fino D., "Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> removal from wastewater using clinoptilolite as adsorbent", *Environmental Science and Pollution Research*, 28(19), s.24355–24361, 2021.

Basabe, Y.G., Iznaga, I.R., Charles de Menorval, L., Llewellyn, P., Maurin, G., Lewis, D.W., Binions, R., Autie, M., Salvador, A.R.R., "Step-wise dealumination of natural clinoptilolite: Structural and physicochemical characterization", *Microporous and Mesoporous Materials*, 135(1–3), s.187–196, 2010.

Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., Ferrara, N., "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation", *Nature Medicine*, 5(6), s.623–628, 1999.

Granito, R.N., Renno, A.C., Yamamura, H., Cruz de Almeida, M., Luiz Menin Ruiz, P., Araki Ribeiro, D., "Hydroxyapatite from Fish for Bone Tissue Engineering: A Promising Approach", *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 7(2), s.81-90, 2018.

Gülen, J., Zorbay, F., Arslan, S., "Zeolitler ve Kullanım Alanları", *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 2(1), s.63–68, 2012.

Güven, Ş.Y., "Biyouyumluluk ve biyomalzemelerin seçimi", *Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2(3), s.303-311, 2014.

Hench, L.L., "Bioceramics: From Concept to Clinic", *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7), s.1487–1510, 1991.

İnsal, B., Pişkin, İ., "Kemik Dokusunun Fizyolojisi", *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1), s. 28–32, 2017.

Iqbal, N., Abdul Kadir, M.R., Mahmood, N.H. Bin, Yusoff, M.F.M., Siddique, J.A., Salim, N., Froemming, G.R.A., Sarian, M.N., Balaji Raghavendran, H.R., Kamarul, T., "Microwave synthesis, characterization, bioactivity and in vitro biocompatibility of zeolite–hydroxyapatite (Zeo–HA) composite for bone tissue engineering applications", *Ceramics International*, 40(10), s.16091–16097, 2014.

Iqbal, N., Abdul Kadir, M.R., Iqbal, S., Razak, S.I.A., Shahid Rafique, M., Bakhsheshi-Rad, H.R., Hasbullah Idris, M., Khattak, M.A., Raghavendran, H.R.B., Abbas, A.A., "Nano-hydroxyapatite reinforced zeolite ZSM composites: a comprehensive study on the structural and in vitro biological properties", *Ceramics International*, 42(6), s.7175–7182, 2016.

Joughehdoust, S., Manafi, S., "Application of Zeolite in Biomedical Engineering: A Review", *Iran International Zeolite Conference (IIZC'08)*, Tehran, 2008.

Kalkandelen, C., Gunduz, O., Akan, A., Oktar, F.N., "Part 1: clinoptilolite–alumina–hydroxyapatite composites for biomedical engineering", *Journal of the Australian Ceramic Society*, 53(1), s.91–99, 2017.

Kapinas, K., Delany, A.M., "MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling", *Arthritis Research & Therapy*, 13(3), s.220, 2011.

Karaoğlan, G., "Klinoptilolit içeren polimer nanopartik llerin cryptosporidium parvum üzerine in vitro etkinliğinin araştırılması", *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.16-22, Aydın, 2017.

Katsimbri, P., "The biology of normal bone remodelling", *European Journal of Cancer Care*, 26(6), s.e12740, 2017.

Kianfar, E., "Zeolites: Properties, Applications, Modifications and Selectivity", *Islamic Azad University, Department of Chemical Engineering*, s.1-19, Iran, 2020.

Kilimci, F.S., Kara, M.E., "Kemiklerin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan temel biyomekanik kavramlar", *Animal Health Prod and Hyg.*, 2(2) s.235-239, 2013

Kırkık, D., Karabulut, B.,  zt rk, K., Kalkanlı Taş, S., "Dental uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler", *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8(2), s.145–153, 2019.

Kocak, F.Z., "Smart pH and thermosensitive injectable hydrogels: chitosan – hydroxyapatite – heparin based functionalised biomaterials for bone regeneration", *Lancaster University, Doctoral Thesis*, s.1-251, United Kingdom, 2021.

Kocak, F.Z., Kucukdeveci, N., Daldiken, E., "Zeolitlerin  zellikleri ve doku mühendisliği uygulamaları", *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 11(2), s.8-15, 2022.

Kuruca, S., Ak n Dar, K., Kapucu, A.,  zerkan, D., "1,2 dimetilhidrazin ile oluşturulan kolon kanseri modelinde zeolit destekli beslenmenin kanser gelişimine etkileri", *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 83(3), s.234–240, 2020.

Landi, E., Tampieri, A., Mattioli-Belmonte, M., Celotti, G., Sandri, M., Gigante, A., Fava, P., Biagini, G., "Mg- and Mg,CO<sub>3</sub>-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour", *Journal of the European Ceramic Society*, 26(13), s.2593–2601, 2006.

Lee, Y., Hahm, Y.M., Lee, D.H., Matsuya, S., Nakagawa, M., Ishikawa, K., "Preparation and Characterization of Macroporous Carbonate-Substituted Hydroxyapatite Scaffold", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(8), s.2618–2622, 2008.

Liu, X., Wu, K., Gao, L., Wang, L., Shi X., "Biomaterial strategies for the application of reproductive tissue engineering", *Bioactive Materials*, 14, s.86–96, 2022.

Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R., Petite, H., "Engineering bone: challenges and obstacles", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(1), s.72–84, 2005.

Manicone, P.F., Rossi Iommetti, P., Raffaelli, L., "An overview of zirconia ceramics: Basic properties and clinical applications", *Journal of Dentistry*, 35(11), s.819–826, 2007.

Mansouri, N., Rikhtegar, N., Panahi, H.A., Atabi, F., Shahraki, B.K., "Porosity, characteriza-tion and structural properties of natural zeolite – clinoptilolite – as a sorbent", *Environment Protection Engineering*, 39(1), s.140-152, 2013.

Mantsopoulos, K., Thimsen, V., Wohlleben, F., Taha, L., Sievert, M., Müller, S.K., Goncalves, M., Iro, H., Hornung, J., "Hydroxyapatite bone cement in the reconstruction of defects of the long process of the incus: Personal experience and literature review", *American Journal of Otolaryngology*, 42(4), s.103002, 2021.

McMahon, R.E., Wang, L., Skoracki, R., Mathur, A.B., "Development of nanomaterials for bone repair and regeneration", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101B(2), s.387–397, 2013.

Serati-Nouri, H., Jafari, A., Roshangar, L., Dadashpour, M., Pilehvar-Soltanahmadi, Y., Zarghami, N., "Biomedical applications of zeolite-based materials: A review", *Materials Science and Engineering:C*, 116, s.111225, 2020.

O'Brien, F.J., "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering", *Materials Today*, 14(3), s.88–95, 2011.

Özkan, A., Şişik, N., Öztürk, U., "Kompozit malzemelerin ağız, yüz, çene cerrahisinde kullanımı ve malzeme uygunluklarının belirlenmesi", *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4, s.227-242, 2016.

Panda, S., Biswas, C.K., Paul, S., "A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering", *Ceramics International*, 47(20), s.28122–28144, 2021.

Pasinli, A., "Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler", *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4, s.25-34, 2004.

Pavelić, K., Hadžija, M., Bedrica, L., Pavelić, J., Crossed D signikić, I., Katić, M.; Kralj, M., Bosnar, M.H., Kapitanović, S., Poljak-Blaži, M., Križanac, S., Stojković, R., Jurin, M., Subotić, B., Čolić, M., "Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy", *Journal of Molecular Medicine*, 78(12), s.708–720, 2001.

Pavelić, S.K., Medica, S.J., Gumbarević, D., Filošević, A., Pržulj, N., Pavelić, K., "Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo", *Frontiers in Pharmacology*, 9, s.1350, 2018.

Pazarçeviren, A. E., Keskin, D., & Tezcaner, A., Investigation of zeolite/PCL-PEG-PCL composite scaffolds for bone tissue engineering, 2016.

Petkova, V., Serafimova, E., Petrova, N., Pelovski, Y., "Thermochemistry of triboactivated natural and NH<sub>4</sub>-exchanged clinoptilolite mixed with Tunisian apatite". *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 105(2), 535–544, 2011.

Pietak, A.M., Reid, J.W., Stott, M.J., Sayer, M., "Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics", *Biomaterials*, 28(28), s.4023–4032, 2007.

Polat, E., Karaca M., Demir, H., Onus, A.N., "Use of natural zeolite (clinoptilolite) in agriculture", *Journal of fruit and ornamental plant research*, 12(1), s.183-189, 2004.

Pu'ad, N.A.S.M., Abdul Haq, R.H., Mohd Noh, H., Abdullah, H.Z., Idris, M.I., Lee, T.C., "Synthesis method of hydroxyapatite: A review", *Materials Today: Proceedings*, 29, s.233–239, 2020.

Puszka, A., Kneć, M., Franus, W., Podkościelna, B., "Preparation and thermo-mechanical characteristics of composites based on epoxy resin with kaolinite and clinoptilolite", *Polymers*, 15(8), s.1898, 2023.

Raddall, G., Mello, I. Leung, B.M., "Biomaterials and Scaffold Design Strategies for Regenerative Endodontic Therapy", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, s.317, 2019.

Rehman, I., Bonfield, W., "Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8(1), s.1–4, 1997.

Rodríguez-Fuentes, G., Ruiz-Salvador, A.R., Mir, M., Picazo, O., Quintana, G., Delgado, M., "Thermal and cation influence on ir vibrations of modified natural clinoptilolite", *Microporous and Mesoporous Materials*, 20(4–6), s.269–281, 1998.

Roohani, I., Cheong, S., Wang, A. "How to build a bone? - Hydroxyapatite or posner's clusters as bone minerals", *Open Ceramics*, 6, s.100092, 2021.

Sadeghinia, A., Soltani, S., Aghazadeh, M., Khalilifard, J., Davaran, S., "Design and fabrication of clinoptilolite–nanohydroxyapatite/chitosan–gelatin composite scaffold and evaluation of its effects on bone tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(2), s.221–233, 2020.

Schiavo, L., Boccia, V., Aversa, L., Verucchi, R., Carotenuto, G., Valente, T., "Natural Clinoptilolite Nanoplatelets Production by a Friction-Based Technology", *IOCN 2023*, MDPI, s.11, 2023.

Shumskaya, L.G., Kirillova, Ye.A., Yusupov, T.S., "Controlled changes in technological properties of phosphates in mechanical activation with zeolites", *Journal of Mining Science*, 35(1), s.96–100, 1999.

Singh, J., Chatha, S.S., Singh, H., "Characterization and corrosion behavior of plasma sprayed calcium silicate reinforced hydroxyapatite composite coatings for medical implant applications", *Ceramics International*, 47(1), s.782–792, 2021.

Sopyan, I, Mel, M., Ramesh, S., Khalid, K.A., "Porous hydroxyapatite for artificial bone applications', *Science and Technology of Advanced Materials*, 8(1–2), s.116–123, 2007.

Tırnakçı, B., Salt Y., Salt, İ., Keyf, S., "Klinoptilolit dolgulu PVA membranların hazırlanması, karakterizasyonu ve pervaporasyon ile desalinasyon çalışması', *European Journal of Science and Technology*, 18, s.711–718, 2020.

Tok, S., "Doğal zeolit(klinoptilolit) ile bakır adsorbsiyonu", *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.2-15, İstanbul, 2009.

Top, A., Ülkü, S., "Silver, zinc, and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity", *Applied Clay Science*, 27(1–2), s.13–19, 2004.

Tüfekci, K., "Gerinim hızının kortikal kemiğin mekanik özellikleri üzerindeki etkisinin incelenmesi", *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, Isparta, 2008.

Watanabe, Y., Ikoma, T., Suetsugu, Y., Yamada, H., Tamura, K., Komatsu, Y., Tanaka, J., Moriyoshi, Y., "Type-A zeolites with hydroxyapatite surface layers formed by an ion exchange reaction", *Journal of the European Ceramic Society*, 26(4–5), s.469–474, 2006.

Zhan, Y., Lin, J., Li, J. "Preparation and characterization of surfactant-modified hydroxyapatite/zeolite composite and its adsorption behavior toward humic acid and copper(II)", *Environmental Science and Pollution Research*, 20(4), s.2512–2526, 2013.

Zhou, H., Lee, J., "Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, 7(7), s.2769–2781, 2011.