T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN REJENERATİF ENJEKTE EDİLEBİLİR MALZEME ÜRETİMİ

Jülide Hazal TÜRKCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Malzeme Programı

Danışman

Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR

Haziran, 2021

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN REJENERATİF ENJEKTE EDİLEBİLİR MALZEME ÜRETİMİ

Jülide Hazal TÜRKCAN tarafından hazırlanan tez çalışması 17.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, Malzeme Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Mehmet Emin ERDİL, Üye

Acıbadem Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILMAZER, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları için Rejeneratif Enjekte Edilebilir Malzeme Üretimi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Jülide Hazal TÜRKCAN

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü FYL-2020-3834 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bilime…

TEŞEKKÜR

Sunulan tez çalışmasıyla beraber tamamlamış olduğum yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman özverili, sevecen ve öğretici yaklaşımıyla bana yol gösteren, disiplinlerarası çalışma ve çok yönlü düşünme kabiliyeti kazandıran ve ayrıca, akademisyenlik yolunda tecrübelerini aktararak mesleki anlamda da gelişimimi destekleyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR'a kalpten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması analiz süreçlerimde değerli yardımlarıyla bana destek olan Doç. Dr. Serap ACAR DERMAN'a ve Doç. Dr. Oğuz Kaan ÖZDEMİR'e, yüksek lisansım boyunca tüm bilgi birikimiyle çalışmalarıma katkı sağlayan Yüksek Kimyager Abdullah TORAMAN'a, her koşulda yardımlarını esirgemeyen değerli meslektaşım Arş. Gör. Kadir SAĞIR'a, içtenlikleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren Biyoteknoloji Laboratuvarı ailesine ve manevi desteklerini sunan kıymetli dostlarıma teşekkürlerimi iletiyorum.

Son teşekkürümü ise elimden tuttuğu ilk andan itibaren bir kez bile bırakmayan, sevgi ve ilgisini üzerimden hiç eksik etmeyen, bugünlere gelebilmemdeki en büyük destekçim ve gururum olan annem Nurdan TÜRKCAN'a sunarım.

Jülide Hazal TÜRKCAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix

KISALTMA LİSTESİ x

ŞEKİL LİSTESİ xii

TABLO LİSTESİ xiv

ÖZET xv

ABSTRACT xvii

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti ... 1

1.2 Tezin Amacı ... 6

1.3 Hipotez ... 7

2 İSKELET SİSTEMİ VE KEMİK DOKU 8

2.1 İskelet Sistemi ve Önemi ... 8

2.2 Kemik Doku ... 11

2.2.1 Kemik Matrisi ... 11

2.2.2 Kemik Hücrelerinin Morfolojisi ... 13

2.3 Kemik Modelleme ... 17

2.4 Yeniden Yapılandırma (Remodelling) ... 18

3 KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE UYGULAMALARI 20

3.1 Doku Mühendisliğine Giriş ... 20

3.1.1 Kemik Doku Mühendisliği Uygulamalarında Temel Kavramlar ... 21

3.2 Kemik Greftleme Yöntemi ve Geçmişten Günümüze Klinik Önemi ... 36

3.3 Kemik Greft Malzemeleri ve Özellikleri ... 37

3.3.1 Doğal Kökenli Kemik Greft Malzemeleri ... 38

3.3.2 Sentetik Kökenli Kemik Greft Malzemeleri ... 40

3.4 Enjekte Edilebilir Kemik Greftleri ve Klinik Üstünlükleri ... 52

3.4.1 Enjekte Edilebilir Kemik Greft Malzemeleri ve Uygulamaları ... 54

4 DENEYSEL ÇALIŞMALAR 65

4.1 Materyal ve Yöntem 65

4.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Cihazlar 65

4.1.2 Beta-Trikalsiyum Fosfat (β-TCP) Biyoseramik Toz Sentezi 68

4.1.3 Hiyalüronik Asit/Nanokristalin Selüloz (HA/NCC) Jellerin Hazırlanması 73

4.1.4 Zirkonyum Oksit (ZrO_2) Radyoopaklaştırıcı Ajan Sentezi 75

4.1.5 Enjekte Edilebilir Greft Malzemelerinin (IBGM) Hazırlanması 78

4.2 Karakterizasyon Çalışmaları İçin Numune Hazırlama Analiz Protokolleri 81

4.2.1 Stabilizasyon 81

4.2.2 Tane Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü 81

4.2.3 X-Işını Kırınımı (XRD) 81

4.2.4 Taramalı Elektron Mikroskobisi (SEM-EDS) 82

4.2.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi(FTIR) 82

4.2.6 Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi(ICP-MS) 83

4.2.7 Termal Analiz (Termogravimetrik analiz (TGA)-Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)) 83

4.2.8 Reometre Analizi 84

4.2.9 Hücre Kültürü Çalışması (MTT-In Vitro Sitotoksisite/Hücre Canlılığı Testi) 84

5 SONUÇ VE ÖNERİLER 85

5.1 Stabilizasyon Sonuçları ve Değerlendirilmesi 85

5.2 Tane Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları ve Değerlendirilmesi 86

5.2.1 ZrO_2 Radyoopaklaştıcı Ajanı Tane Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü Sonuçları ve Değerlendirilmesi 86

5.2.2 Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi Zeta Potansiyel Ölçümü Sonuçları ve Değerlendirilmesi 88

5.3 X-Işını Kırınımı (XRD) Sonuçları ve Değerlendirilmesi 90

5.3.1 β-TCP Biyoseramik Tozu XRD Sonuçları ve Değerlendirilmesi 90

5.3.2 ZrO_2 Radyoopaklaştıcı Ajanı XRD Sonuçları ve Değerlendirilmesi 91

5.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-EDS) Sonuçları ve Değerlendirilmesi. 93

5.4.1 β-TCP Biyoseramik Tozu SEM-EDS Sonuçları ve Değerlendirilmesi 93

5.4.2 ZrO_2 Radyoopaklaştıcı Ajanı SEM-EDS Sonuçları ve Değerlendirilmesi 97

5.4.3 Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi SEM-EDS Sonuçları ve Değerlendirilmesi 103

5.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları ve Değerlendirilmesi 105

5.5.1 β-TCP Biyoseramik Tozu FTIR Sonuçları ve Değerlendirilmesi 105

5.5.2 ZrO_2 Radyooapaklaştıcı Ajanı FTIR Sonuçları ve Değerlendirilmesi 107

5.5.3 HA/NCC Jel ve Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi FTIR Sonuçları ve Değerlendirilmesi 108

5.6 Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) Sonuçları ve Değerlendirilmesi 109

5.7 Termal Analiz (Termogravimetrik Analiz (TGA)-Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)) Sonuçları ve Değerlendirilmesi 110

5.8 Reometre Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi 111

5.9 Hücre Kültürü Çalışması Sonuçları ve Değerlendirilmesi 114

5.10 Genel Değerlendirme ve Yorumlar 116

KAYNAKÇA **120**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **146**

SİMGE LİSTESİ

n	Akış Davranış İndisi
K	Akışkanlık İndisi
α	Alfa
Å	Angström
β	Beta
dk	Dakika
°	Derece
E	Elastiklik Modülü
eV	Elektronvolt (1,6 x 10^{-19} J)
γ	Gama
GPa	Giga Pascal
g	Gram
Kg	Kilogram
F	Kuvvet
L	Litre
MPa	Mega Pascal
m	Metre
µ	Mikro
µg/g	Mikrogram/Gram
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm^2	Milimetre Kare
mm^3	Milimetre Küp
mm	Milimetre
ms	Milisaniye
ppm	Milyonda 1 Birim
ng/g	Nanogram/Gram
nm	Nanometre
N	Newton
pH	Potansiyel Hidrojen
sa	Saat
s	Saniye
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
θ	Teta
v	Vibrasyon
ρ	Yoğunluk

KISALTMA LİSTESİ

Al	Alüminyum
Al_2O_3	Aluminyum Oksit
As	Arsenik
Au	Altın
B	Bor
Ba	Baryum
BCP	Bifazik Kalsiyum Fosfat
C	Karbon
Ca/P	Kalsiyum/Fosfat
Ca	Kalsiyum
CA	Sitrik Asit
CaP	Kalsiyum Fosfat
Cd	Kadmiyum
CDHA	Kalsiyum Eksik Hidroksiapatit
Cl	Klor
Co	Kobalt
CO_2	Karbondioksit
Cr	Krom
CS	Kalsiyum Sülfat
Cu	Bakır
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
E	Elasiklik Modülü
EDS	Enerji Dağılımı Spektrometresi
Fe	Demir
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskobisi
H	Hidrojen
HA	Hiyalüronik Asit
HAp	Hidroksiapatit
Hg	Civa
IBGM	Enjekte Edilebilir Kemik Greft Malzemeleri
ICP-MS	Endüktif Eşleşmiş Plazma- Kütle Spektrometresi
K_{1C}	Kırılma Tokluğu
Mg	Magnezyum
Mo	Molibden
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NCC	Nanokristalin Selüloz
Ni	Nikel
O	Oksijen
OH^-	Hidroksil İyonu
P	Fosfor

Pb	Kurşun
Pd	Paladyum
PO_4^{3-}	Fosfat İyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Si	Silisyum
TCP	Trikalsiyum Fosfat
TGA	Termogravimetrik Analiz
Ti	Titanyum
V	Vanadyum
XRD	X-Işını Kırınımı
Zn	Çinko
Zr	Zirkonyum
ZrO_2	Zirkonyum Oksit
α-TCP	Alfa-Trikalsiyum Fosfat
β-TCP	Beta-Trikalsiyum Fosfat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Sağlıklı bir insan vücuduna ait iskelet sistemi [43] 9
Şekil 2.2 Kemiğin hiyerarşik yapısı [52] 12
Şekil 2.3 Kemik dokunun yapım ve yıkımında görev alan hücreler [56] 13
Şekil 2.4 Kemik yapımından sorumlu olan osteoblast hücreleri [40] 14
Şekil 2.5 Osteoblast hücrelerinin osteosit hücrelerine farklılaşması [63] 15
Şekil 2.6 Gelişmiş bir osteosit hücresi [64] 16
Şekil 2.7 Kemik yıkımından sorumlu olan osteoklastlar hücreleri [40] 17
Şekil 2.8 Trabeküler kemikte yapım-yıkım döngüsü [72] 19
Şekil 3.1 İdeal bir kemik doku üretiminde incelenmesi gereken parametreler [81] 22
Şekil 3.2 Hidroksiapatit birim hücresi [189] 47
Şekil 3.3 Farklı tasarımlara sahip sentetik hidroksiapatit doku iskeleleri [191] ... 48
Şekil 3.4 β-TCP'nin beş farklı katyon bölgesine ait koordinasyon geometrisi [198] 49
Şekil 3.5 Hiyalüronik asit kimyasal yapısı 56
Şekil 3.6 Sitrik asitin kimyasal yapısı 61
Şekil 3.7 Doğrusal bir polimer olan selülozun kimyasal yapısı 62
Şekil 4.1 β-TCP sentezi sırasında pH ayarlama işlemi 69
Şekil 4.2 Çözelti 1 ve Çözelti 2'ye ait görüntüler 70
Şekil 4.3 CDHA'ya ait filtre kekinin görüntüsü 70
Şekil 4.4 Sinterleme sonrası β-TCP biyoseramik tozu 71
Şekil 4.5 (a, b) Mekanik karıştırma altında gerçekleştirilen HA jel sentezi, (c) sodyum hiyalüronat tozunun kontrollü olarak ilavesi ve (d) nihai ürün örnekleri 73
Şekil 4.6 Farklı oranlarda HA/NCC içeren nihai jeller 75
Şekil 4.7 Manyetik karıştırma altında gerçekleştirilen ZrO_2 sentezi 76
Şekil 4.8 ZrO_2 sentezine ait yaşlandırma işlemi 76
Şekil 4.9 Zirkonya biyoseramik tozlarının farklı kurutma prosesleri (a) etüv, (b) rotary ve (c) liyofilizatör kurutma 77
Şekil 4.10 Enjekte edilebilir kemik greft malzemeleri üretim şeması 79
Şekil 4.11 IBGM üretimi; (a) SpeedMixer cihazı kullanımı öncesi toz ve toz+jel, (b ve c) SpeedMixer uygulaması ve (d) karıştırma sonrası enjekte edilen IBGM 80
Şekil 5.1 Bir ay boyunca farklı koşullarda depolanan HA/NCC jeller 85
Şekil 5.2 (a) Rotary, (b) liyofilizatör ve (c) etüv cihazları kullanılarak kurutulmuş numunelerin yoğunluğuna göre boyut dağılımları 88
Şekil 5.3 (a) R4-1, (b) R3-1, (c) R3-24 β-TCP numunelerin sinterleme işlemi sonrasına ve (d) ZrO_2'ye ait XRD spektrumları 92
Şekil 5.4 R4-1 numunesine ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri 93
Şekil 5.5 R3-1 numunesine ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri 94

Şekil 5.6 R3-24 numunesine ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri 95
Şekil 5.7 (a) R4-1, (b) R3-1, (c) R3-24 β-TCP numunelerine ait EDS spektrumları 96
Şekil 5.8 Suya ait basınç-sıcaklık faz diyagramı 97
Şekil 5.9 Liyofilizatör kurutma uygulanmış ZrO_2'ye ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri 98
Şekil 5.10 Yapıdaki neme bağlı olarak köprü oluşumu (a) ve topaklanma (b) 99
Şekil 5.11 Rotary kurutma uygulanmış ZrO_2'ye ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri 100
Şekil 5.12 Etüv kurutma uygulanmış ZrO_2'ye numunesine ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki 101
Şekil 5.13 (a) Liyofilizatör, (b) rotary ve (c) etüv kurutma uygulanan ZrO_2 numunelerine ait EDS spektrumları 102
Şekil 5.14 IBGM 2'ye ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri 104
Şekil 5.15 Geliştirilen optimum özelliklere sahip IBGM 2'ye ait EDS spektrumları 105
Şekil 5.16 Farklı koşullarda sentezlenen β-TCP biyoseramiklerine ait FTIR spektrumları 106
Şekil 5.17 Farklı kurutma yöntemleriyle üretilen ZrO_2 toz numunelerine ait FTIR spektrumları 107
Şekil 5.18 Enjekte edilebilir greft malzemesine ait FTIR spektrumları 108
Şekil 5.19 Yaş enjekte edilebilir greft malzemesine ait TGA/DSC eğrisi 110
Şekil 5.20 37°C'de düşük vakum koşullarında elde edilen kuru numunelere ait TGA/DSC eğrisi 111
Şekil 5.21 IBGM 2'ye ait viskozite-kayma hızı grafiği 112
Şekil 5.22 MTT hücre canlılığı (%)'sine ait sütun grafiği 115

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 İnsan femur kortikal kemiğine ait mekanik özellikler [49]..... 11
Tablo 3.1 Doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli biyomalzemelerin avantaj ve dezavantajları [96], [97], [98]..... 26
Tablo 3.2 Biyomalzemeler, hücreler ve büyüme faktörlerine ait özellikler [103]. 28
Tablo 3.3 Ticari enjekte edilebilir ürün örnekleri 58
Tablo 4.1 Kullanılan sarf malzemeleri ve teknik özellikleri..... 66
Tablo 4.2 Kullanılan alet-teçhizat adları, marka-modelleri ve kullanım amaçları. 67
Tablo 4.3 β-TCP biyoseramik tozu sentez reçetelerine ait işlem basamakları..... 71
Tablo 5.1 Etüv, liyofilizatör ve rotary cihazlarında kurutmaya tabi tutulmuş numunelerin ortalama zeta tane boyutları (d.nm), zeta potansiyel değerleri (mV), efektif çapları (nm) ve polidispersite indeksleri (PDI)... 87
Tablo 5.2 HA/NCC jellerin zeta potansiyel değerleri..... 89
Tablo 5.3 Faz ayrışması sergilemeyen numunelere ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları..... 89
Tablo 5.4 Farklı koşullarda sentezlenen β-TCP numunelerine ait Ca/P mol oranları..... 97
Tablo 5.5 Farklı kurutma yöntemlerine ait ağırlıkça element yüzdeleri (%) 103
Tablo 5.6 IBGM 2'ye ait kantitatif tayin sonuçları.....109

ÖZET

Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Rejeneratif Enjekte Edilebilir Malzeme Üretimi

Jülide Hazal TÜRKCAN

Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR

Kemik dokunun iyileşebilmesini engelleyen ve fonksiyon kayıplarıyla sonuçlanan doku hasarlarında, rejenerasyonu desteklemek amacıyla uygulanan yöntemlerden biri de greftlemedir. Klinik kullanıma uygun granül, blok veya putty gibi farklı formlarda beta-trikalsiyum fosfat (β-TCP) esaslı ürünler bulunmakla birlikte, her vakaya uygun olmama, implante zorluğu veya enfeksiyon riski gibi dezavantajları bulunabilmektedir. Böylece, minimal invaziv bir ameliyatla defekt bölgeye yerleştirilebilen, enfeksiyon riskini azaltan ve uygulama kolaylığı sağlayan enjekte edilebilir kemik greft malzemeleri (IBGM) önem kazanmaktadır. Polimerik taşıyıcı faz ve aktif biyoseramiklerden oluşan IBGM'lerde karşılaşılan problemlerinden biri, depolama veya uygulama esnasında oluşan faz ayrışmasıdır. IBGM'lerin kullanıma hazır olabilmesi için stabilitesi oldukça önemlidir.

Tez çalışması kapsamında; taşıyıcı faz olarak kullanıldığında biyomalzeme-doku adezyonunu arttıran, osteoklast hücrelerinin farklılaşmasını önleyen ve kemik oluşumunu hızlandıran hiyalüronik asit (HA), polimerik sistemlerde stabilizasyon sağladığı bilinen nanokristalin selülozla (NCC, ağırlıkça %0,1, %0,3 ve %0,5) birlikte kullanılmıştır. Ayrıca, sitrik asit (CA) stabilizasyon ajanının partikül aglomerasyona etkileri incelenmiştir. Bu doğrultuda, 25:75, 35:60, 40:60 ve 50:50 jel/toz

oranlarında CA katkılı ve katkısız biyonanokompozitler geliştirilmiştir. Ayrıca, aktif faz olarak β-TCP'ye ve radyoopaklaştırıcı ajan olarak kullanılan zirkonyum oksite (ZrO_2, ağırlıkça %1) ait optimum sentez koşulları incelenmiştir. Numunelerin faz kararlılıkları stabilizasyon değerlendirmesiyle, tane boyutları ve potansiyel değerleri zeta ölçümleriyle, kristallografik özellikleri X-ışını kırınımıyla (XRD), morfolojileri ve faz dağılımları taramalı elektron mikrokobisiyle (SEM-EDS), fonksiyonel gruplar Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisiyle (FTIR), elemental tayin endüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresiyle (ICP-MS), sıcaklığa ve zamana bağlı değişimler termal analizle (TGA/DSC), reolojik özellikleri reometre ve *in vitro* sitotoksisite özellikleri ise MTT-Hücre kültürüyle belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; 50:50 jel/toz oranlarına sahip numuneler hariç diğer 6'sında faz ayrışması meydana geldiği ve CA ilavesinin partikül aglomerasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar IBGM'nin yüksek biyouyumluluğa sahip olduğunu göstermiştir. Böylece sunulan tez çalışması kapsamında; doğrudan klinik kullanıma hazır potansiyel bir IBGM geliştirilmiştir. Ancak ürünün cerrahi uygulamalara sunulabilir özellikleri tam olarak sağlaması için performansının iyileştirilmesi ve *in vivo* çalışmaların tamamlanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kemik, enjekte edilebilir greft malzemesi, β-trikalsiyum fosfat, faz ayrışması, stabilizasyon

ABSTRACT

Production of Regenerative Injectable Material For Bone Tissue Engineering

Jülide Hazal TÜRKCAN

Department of Metallurgical and Materials Engineering

Master of Science Thesis

Advisor: Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR

Grafting is one of the methods used to support the regeneration of bone tissue that losses its functions. Although there are beta-tricalcium phosphate (β-TCP) based products in different forms such as granules, blocks, or putty suitable for clinical usage, they have some disadvantages. Thus, injectable bone graft materials (IBGM), which can be placed in the defect area with minimally invasive surgery, reduce the risk of infection and provide ease of application, gain importance. The main problem encountered in IBGMs consisting of polymeric carriers and active-bioceramics is phase separation.

Within the scope of the thesis, hyaluronic acid (HA), as a carrier phase, which increases biomaterial-tissue adhesion, prevents osteoclast differentiation, and accelerates bone formation, was combined with different amounts of stabilizer nanocrystalline cellulose. As another stabilizer citric acid (CA) effect on particle agglomeration was also investigated. Thus, bionanocomposites with/without CA doping were developed in gel/powder ratios of 25:75, 35:60, 40:60, and 50:50. Moreover, optimum synthesis conditions of β-TCP and zirconium oxide (ZrO_2, 1%

wt.) used as radiopacity agent, were determined. Phase stability of final products by stabilization assessment, grain sizes, and potentials via zeta measurements, crystallography by X-ray diffraction, morphologies, and phase distributions by scanning electron microscopy, the functional groups via Fourier transform infrared spectroscopy, elemental analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometer, determination of changes depending on temperature and time by thermal analysis, rheology via rheometer and *in vitro* cytotoxicities were characterized by MTT-Cell culture.

According to the results; except for the samples with 50:50 gel/powder ratios, the phase separation occurred, and the CA addition reduced the particle agglomeration. Thus, a potential IBGM with high biocompatibility that is ready for clinical use was developed. However, for the product to fully provide the desired features for surgical applications, its performance needs to be improved and *in vivo* studies must be completed.

Keywords: Bone, injectable graft material, β-tricalcium phosphate, phase separation, stabilization

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kemik dokunun yeniden yapılanma (remodelling) mekanizması kemiğin yapısal, biyokimyasal ve biyomekanik bütünlüğünü korumak ve mineral homeostazını (denge) desteklemek için memeli iskelet dokusunun sürekli olarak yenilendiği temel bir süreçtir [1]. Kemik yeniden şekillenmesinin beslenme durumunun, humoral faktörler, otonom sinir sistemi ve biyomekanik stresler gibi birçok faktör tarafından düzenlendiği düşünülmektedir [2]. Bu süreç, hasar görmüş kemiğin onarımı için gerekli olmakla birlikte sert dokunun düzenli olarak yıkımını ve yeniden oluşumunu içermektedir [3]. Osteoartrit veya osteoporoz gibi yaşa bağlı hastalıklar, alveolar kemik rezorpsiyonu veya omurga kırıkları gibi doku farklılaşmaları ve omurlararası disklerin bozulması veya omurilik kanalının daralması gibi doğuşsal kusurlar örnek olmak üzere birçok nedenle kemik dokunun yeniden şekillenme mekanizması bozulabilmekte ve dokuda deformasyon veya disfonksiyon meydana gelebilmektedir [4]. Ayrıca, tümörün veya enfeksiyonun varlığı gibi bazı durumlarda defekt bölgeyi çevreleyen dokunun işlevselliği ve kalitesi zayıf olmakta ve bu durum kendiliğinden gerçekleşmesi gereken kemik restorasyonunu daha da zorlaştırmaktadır [5]. Yüksek hasarlarla sonuçlanan kritik kemik kusurlarında dokuya kaybettiği özelliklerini ve metabolik faaliyetlerini yeniden kazandırmak amacıyla uygulanan yöntemlerden biri de kemik greftleme işlemidir. Bu işlem, kemik rejenerasyonunu destekleyecek bir materyalin hasarlı bölgeye yerleştirilmesi ve yeni kemik oluşumunu sağlaması prensibine dayanmaktadır [6]. Burada dikkat edilmesi gereken önemli parametrelerden biri, kemik greftinin dokunun büyüyebileceği yeterli alanı sağlayabilmesi gerekliliğidir. Doğal kemik doku oluşumu gerçekleştikçe, genellikle greft materyali ile yer değiştirmekte ve çevre dokuya tamamen bütünleşmiş yeni kemik bölgesi oluşmaktadır [7].

Hastanın tedavisi için seçilecek ideal malzemeler gerekli yük taşıma işlevlerini yerine getirebilecek yeterli mukavemete, yeni oluşacak doğal kemik doku ile yer değiştirilmek üzere biyobozunma kabiliyetine ve konakçı kemik ile olabildiğince hızlı entegrasyonu sağlayacak biyoaktiviteye ve osteointegrasyona sahip olmalıdır [8]. Kemik greftleri kemik onarımı için gerekli osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri sağlayabilecek doğal veya sentetik kökenli malzemelerden oluşmakta olup hem mekanik hem de biyolojik işlev sergilemektedirler [9]. Bir başka ifadeyle, greft materyalleri uygulama sonrası iyileşmenin sağlanması için istenilen yapısal dayanımı ve vaskülarizasyonu sağlamakla beraber hücre yapışması, farklılaşması, polarite, yer değiştirme ve proliferasyon gibi önemli biyolojik süreçlere destek olmaktadırlar [10], [11]. Hastanın kendisinden alınan otogreft, donörden veya kadavralardan alınan allogreft ve farklı türden canlılardan hasat edilen ksenogreft olmak üzere doğal kökenli kemik ikameleri klinik olarak kullanılsada, uygulama esnasında ve sonrasında karşılaşılan bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları hasat alanlarının ve greft materyallerinin yetersizliği, ek cerrahi işlem gerekliliği, artan kan kaybı, ağrı ve iltihap oluşumu, hastalık taşınımı riski ve immün sistem tepkileridir [12]. Bunlarla beraber, özellikle de bakteri veya virüs taşınımı riskini azaltmak amacıyla dondurma, dondurarak kurutma, ışınlama ve demineralizasyon prosesleri gibi ek işlemlerin gerekliliği de bulunmakta ve bu durum maliyeti arttırmaktadır [13]. Bu nedenle, doğal kökenli greftlerin mevcut eksilerini ortadan kaldırarak kemiğin özelliklerini ve füzyonu desteklemek için dokunun inorganik bileşenlerini, fizikokimyasal özelliklerini ve mekanik yapısını taklit edebilen sentetik esaslı greft materyalleri ön plana çıkmaktadır [14]. Bu yapılar doğal ve sentetik polimerler, seramikler veya kompozitler gibi biyomimetik yapı iskelelerinden oluşmakta olup, rejenerasyonu sağlayacak osteokondüktif özelliğe sahiptirler [15].

Sentetik kemik greftleri olarak genellikle, kemik büyümesini teşvik edecek ve kemik dokuya benzer gözenekliliğe sahip kalsiyum içerikli biyoaktif malzemeler (örneğin; biyoaktif seramikler) kullanılmaktadır. Biyoaktif materyaller, cerrahi uygulama sonrası kemik dokunun oluşumu, güçlenmesi ve kenetlenmesi amacıyla biyolojik

ortamla olumlu etkileşimler oluşturarak kemiğin ve fonksiyonlarının yenilenmesini desteklemektedirler [16]. Gerçekleşen etkileşimler fizikokimyasal olayları ve hücresel aktivitelerden kaynaklanan reaksiyonların bir sonucudur. Biyoaktif malzeme-çevre doku arasında oluşan reaksiyon dizisi kısaca cerrahi uygulama sonrası çözünmenin başlaması, çökelme meydana gelmesi ve iyon değişimlerinin gerçekleşmesi olarak ifade edilebilmektedir. Bununla birlikte, sürekli reaksiyon gösteren malzeme yüzeyine yapışan hücreler malzeme ile etkileşime girerek bazı yüzey değişikliklerine neden olmaktadır. Bu durum organik matris birikimine ve mineralizasyona sebep olarak kemik doku iyileşmesine destek sağlamaktadır [17]. Sıklıkla tercih edilen biyoaktif seramik malzemeler; biyoaktif camlar, hidroksiapatit (HAp), β-trikalsiyum fosfat (β-TCP), kalsiyum sülfatlar (CS) veya bunların farklı oranlardaki kombinasyonlarıdır [18]. Kalsiyum fosfat (CaP) esaslı sentetik kemik ikameleri, canlı dokuyla pozitif etkileşimler kurarak olgunlaşmamış hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşmasını desteklemektedir. Bu malzemeler, değişen oranlarda kalsiyum iyonları ve organofosfatlardan oluşan kalsiyum tuzu bileşiklerinden (monokalsiyum fosfat, dikalsiyum fosfat, trikalsiyum fosfat, tetrakalsiyum fosfat veya hidroksiapatit) meydana gelmektedir [19].

CaP'lerin kemikte, dişlerde, kanda, sütte ve ayrıca idrar ve böbrek taşlarındaki varlığı 19. yüzyılın başlarında kanıtlanmış ancak yeterli bilgi sağlanamamıştır. 1930'lu yılların başlarına gelindiğinde ise X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi kullanılarak CaP'lerin kimyasal yapısı değerlendirilmiş ve geleceğe ışık tutabilecek bir dizi çalışma ortaya konulmuştur [20]. Klinik uygulamalar açısından değerlendirildiğinde ise, biyolojik dokulara benzer özellik sergileyen, uygun kristalografik yapıya ve yeterli gözenekliliğe sahip CaP malzemelerin diş hekimliğinde ilk kullanımı 1970'li, ortopedi ve travmatolojide yapı iskelesi olarak kullanımı ise 1980'li yıllara dayanmaktadır [21]. Kemik greftlerinin biyolojik olarak parçalanabilir olması zamanla yerini yeni dokunun alabilmesi için oldukça önemlidir. Bununla birlikte, materyalin degradasyon hızının dikkatlice tasarlanması ve yeni kemik oluşum hızı ile uyumlu olması gerekmektedir [22]. Kullanılan diğer CaP biyoseramikler arasında β-TCP esaslı greftler, iskele emilimi ve kemik

rejenerasyonu arasında nispeten denge sağlayabilmesi nedeniyle ön plana çıkmaktadır. β-TCP, kemik mineraline benzer olarak fizyolojik koşullarda çözünmez ancak genellikle yıkımdan sorumlu osteoklast hücrelerinin yerel asitleşmeye neden olması sonucu rezorbe edilebilmektedir [23]. Klinik uygulamalarda β-TCP'nin bozulma davranışı ve mekanik özellikleri gibi fiziksel parametreler, greft malzemesinin gözeneklilik ve yüzey alanı ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca, β-TCP esaslı materyallerin gözenekli yapıları iyileşme sürecinde görev alacak hücrelerin ihtiyaç duydukları oksijen ve besin maddeleri ile atıkların taşınması kolaylaşmaktadır [24]. Bu malzemelerin porlu yapısı, biyolojik ortamda kontrollü rezorpsiyonu ve osteokondüktif özelliği, hücrelerin ortama tutunması ve bozulma sürecinde açılacak bölgede büyümesi için yeterli alan sağlarken, uzun vadeli hücre büyümeleri için de çatı görevi görmektedir [25]. Bununla birlikte, β-TCP esaslı kemik greft malzemesinin geometrisi biyolojik yanıt konusunda belirleyici bir parametre olduğundan, parçacık boyut ve şekil kontrollü olarak geliştirilmiş mimariye sahip iskelelerin üretilmesi, in vivo defekt iyileşmesi için büyük önem taşımaktadır [26]. Bir diğer belirleyici parametre ise biyoseramiklere uygulanan sinterleme aşamasıdır. Sinterleme ısıl yollarla uygulanarak iyon difüzyonunu indükleyen ve biyoseramik gövdenin sağlamlaşmasına veya tane büyümesine sebep olabilen bir süreçtir. Bu işlem yapıdaki gözenekliliği ve buna bağlı olarak nihai ürünün mekanik özelliklerini belirlemektedir. Greft malzemelerinin mekanik stabilitesi, üretim sürecinden cerrahi uygulamaya kadar tüm aşamalarda yapısal bütünlüğün bozulmasını önleyecek kadar yüksek olmalıdır. β-TCP'nin teorik gerilme mukavemeti 1 ile 10 GPa arasında değişmektedir. Bu değerler 110 GPa olan teorik Young modülünün %1'i ile %10'u arasındadır. Bununla birlikte, basınç ve gerilme mukavemeti süngerimsi kemiğe benzer olan β-TCP biyoseramiklerin çekme ve kesme kuvvetleri altındaki kırılgan doğası nedeniyle deneysel olarak belirlenen gerilme dayanımı çok daha düşük ve zayıf olabilmektedir [27], [28].

Tüm belirleyici parametreler ışığında günümüzde β-TCP esaslı kemik greft malzemeleri, önceden şekillendirilmiş veya uygulama sonrası yerinde sertleşebilenler olmak üzere granül, pelet, blok, putty (macun) veya enjekte

edilebilir gibi farklı formlarda üretilmekte olup; kritik ve karmaşık kemik kırıkları, el cerrahisi, kraniyofasiyal rekonstrüksiyonlar, dental uygulamalar, eklem ve kıkırdak kusurları gibi birçok alanda kullanılmaktadır [29], [30]. Katı ve rijit sinterlenmiş ürünlerin en önemli dezavantajları CaP esaslı greftlerin kırılgan yapısı, zayıf mekanik mukavemeti ve her kemik defektine uygun olmamasıdır [31]. Buna ek olarak, şekillendirmeye olanak tanıyan ve uygulama öncesi toz ve jel fazın ek karıştırılma işlemine gereksinim duyan macun formu ise ameliyat süresini uzatmakta ve enfeksiyon olasılığını arttırmaktadır. Bu nedenle minimal invaziv cerrahi yöntemlerin geliştirilmesi ile doğrudan enjekte edilebilir kemik greft malzemelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Enjektörler ve laparoskip cihazlar yoluyla küçük kesiler uygulanarak ameliyat sürecini kolaylaştıran, cerrahi uygulama bölgesini azaltan ve daha hızlı iyileşme gibi önemli faydalar sağlayan enjekte edilebilir materyaller, hastanede kalış sürecini de kısaltarak gerekli masrafları da azaltmaktadır [32]. Enjekte edilebilir kemik greft malzemeler (IBGM) vücut sıvıları ve biyolojik ortam tarafından parçalanabilen, kemik hücrelerinin yapışmasını ve osteogenezi destekleyen biyomalzemelerden oluşmaktadır [33]. CaP kemik ikameleri üzerine yapılan çalışmalar en az 100 yıllık bir sürece sahip olsa da kemik çimentoları ve enjekte edilebilir sistemler gibi yeni yaklaşımlar, 1982'de Amerikan Diş Hekimleri Birliği bilim adamlarından LeGaros'un yayınladığı sonuçlar ve 1983 yılında Brown ve arkadaşlarının CaP macun yapıları keşfi ile büyük önem kazanmıştır [34], [35], [36]. Bu çalışmayı takiben örneğin 1987'lere gelindiğinde Klein ve arkadaşları sodyum aljinat çözeltisini 0,5-1,0 mm çapında β-TCP granülleriyle birleştirerek enjekte edilmeye uygun bir yapı önermişlerdir. 1988'de ise Gerhart ve arkadaşları jelatin solüsyonun 0,35-0,60 mm çapında β-TCP granülleriyle çapraz bağlanması sonucu geliştirilen enjekte edilebilir CaP malzemesine ait sonuçları yayınlamışlardır [37].

Bahsedilen ve literatürde bulunan benzer çalışmalar sayesinde gerçekleşen olumlu gelişmelerle beraber, doğal veya sentetik kökenli çeşitli polimerik taşıyıcı sistemler ile aktif faz olarak CaP biyoseramiklerin birleştirilmesi sonucu enjekte edilebilir materyaller geliştirilmiş olup, çok fazlı yapılarda karşılaşılan faz ayrışması

(parçacıkların çökelmesi) sorunu henüz tam olarak çözümlenememiştir. Cerrahi uygulamayı ve işlem sonrası doku gelişimini olumsuz etkileyen bu durumun giderilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle IBGM'lerde yapının stabilitesi üzerine yapılan araştırmalar hala sürdürülmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Gerçekleştirilen tez çalışmasının temel amacı; yaş faktörü, hastalık, travma veya kalıtsal anormallikler gibi çeşitli nedenlerle kemik dokusunda oluşabilen deformasyon ve farklılaşmaları gidererek kemiğe eski özelliklerini yeniden kazandıran, kemiğin yapılanma mekanizması, çalışma mekaniği ve fizyolojisine uyumlu, doğrudan kemik doku onarımını destekleyebilen, minimum cerrahi girişim ile defekt bölgeye yerleştirilebilecek, faz stabilitesi sağlanmış, reolojik özellikleri optimize edilmiş ve radyoopak özellik kazandırılmış rejeneratif β-TCP esaslı enjekte edilebilir kemik greft malzemesi üretmektir.

Mevcut enjekte edilebilir greft ürünlerin özellikle depolama süresinde faz ayrılması (seramik partiküllerin aglomerasyonu), ürünün enjekte edilebilirlik özelliğini zayıflatmakta ve klinik uygulamada sorunlara yol açmaktadır. Bunun neticesinde de enjekte edilebilir greftin doku tamirine katkısı beklenenden az olmakta ve oluşan dokunun mukavemetini düşürmektedir. Sunulan tez çalışması kapsamında faz ayrışması sorununun giderilmesi hedeflenmiştir.

Belirtilen amaçlar doğrultusunda ulaşılması beklenen başlıca hedefler;

1. Tüm bağ dokularında ve eklemlerin sinoviyal sıvısında bulunan HA'nın, NCC ile taşıyıcı faz olarak kullanım potansiyelinin belirlenmesi.
2. Yüksek yüzey alanı/hacim oranı sayesinde hücre bağlanmasını, göçünü, çoğalmasını destekleyen; osteokondüksiyon ve kemik büyümesi sağlayan NCC'nin taşıyıcı faz içerisinde farklı oranlarda denenmesiyle optimum parametrelerin belirlenmesi.
3. CA stabilizasyon ajanının sistem stabilitesine etkisinin incelenmesi.

4. ZrO_2 kullanımı ile radyoopak özellik kazandırarak, cerrahi işlem sonrası greftin görüntülenebilmesinin sağlanması.
5. Kemik doku ile uyumlu, medikal saflıkta ve rejeneratif özellikli enjekte edilebilir kemik dolgu malzemesinin üretilmesi.
6. Medikal pazara minimal invazif bir cerrahi müdahale ile kullanılabilecek uluslararası standartlara uygun güvenilir özellikte greft malzemelerin kazandırılması ve ulusal sağlık giderlerinin azaltılmasına katkıda bulunulması.

1.3 Hipotez

Hasar görmüş kemik dokunun rejenerasyonunu desteklemek, eski fonksiyonlarını yeniden kazandırmak, faz ayrışması sorununa çözüm bulmak, depolama (raf ömrü) süresini uzatmak ve klinik kullanımı kolaylaştırmak amacıyla birlikte kullanıldıklarında gelişmiş yapısal bütünlüğe sahip olduğu gözlemlenen hiyalüronik asit/nanokristalin selüloz taşıyıcı sistemi, zirkonya radyoopaklaştırıcı ajanı ve deflokülasyon ajanı olarak sitrik asit ile kullanılarak rejenerasyonu sağlayacak β-trikalsiyum fosfat içeren enjekte edilebilir kemik greft malzemesi üretimi yapılacaktır.

2
İSKELET SİSTEMİ VE KEMİK DOKU

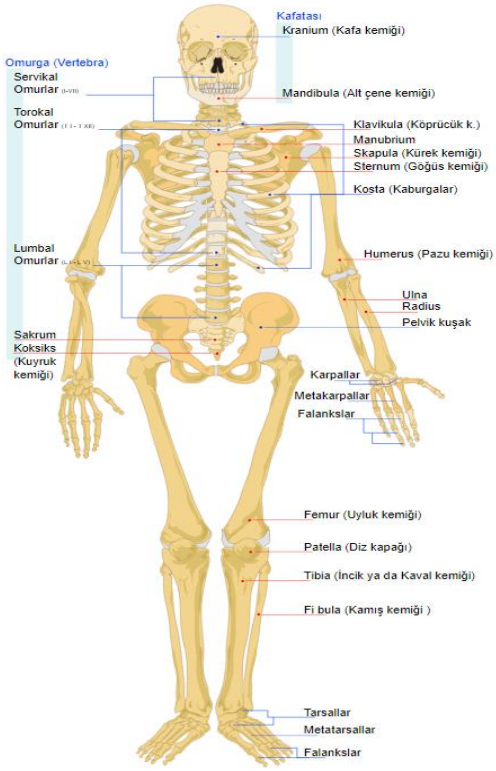
2.1 İskelet Sistemi ve Önemi

İskelet sistemi; kemikler, kıkırdak doku, ligamentler, bağ doku, kan damarları, lenf damarları ve sinirlerin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır [38]. Bu sistem insan vücudundaki en büyük organlar arasında olup toplam vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur [39]. Bununla birlikte iskelet oluşumu omurgalı canlıları omurgasızlardan ayıran temel bir özelliktir. Omurgalılar için yapısal destek sağlamanın yanında kan hücrelerinin üretimi, kalsiyum depolama, endokrin düzenlemeler, iç organların korunması ve hareket yeteneği kazandırma gibi yaşamsal önemli işlevlere de sahiptir [40].

Bu sistemi meydana getiren kemikler; kemik doku, kemik iliği ve bu yapıları çevreleyen periosteumdan (bağ doku) oluşan damarlı ve sinirlerle çevrelenmiş organlardır. Kemik iliği gibi kan hücrelerinin üretiminden (hematopoez) sorumlu yapıları barındırma, vücutta bulunan kalsiyumun yaklaşık %99'unu depolayarak günlük kalsiyum ihtiyacını sağlama ve böylece kalsiyum salımı ile kasların kasılması, kanın pıhtılaşması, sinir impulslarının iletilmesi, asit-baz dengesi sağlama, büyüme faktörleri ve sitokinler için depo görevi görme gibi işlevleri kemik dokunun önemini açıkça ortaya koymaktadır [41].

İskelet sistemini oluşturan kemikler; apendiküler iskelette bulunan uzun kemikler, kısa kemikler, eksenel iskelette bulunan düz kemikler ve düzensiz kemikler olarak sınıflandırılır. Uzun kemikler; klavikula, humeri, radyal, ulna, metakarp, femur, tibia, fibula, metatarsal ve falanj kemikleri olarak ayrılır. Kısa kemikler; karpal ve tarsal kemikleri, patella ve sesamoid kemiklerini içerir. Düz kemikler arasında kafatası, çene kemiği, kürek kemiği, sternum ve kaburga kemikleri bulunur. Düzensiz kemikler ise omurlar, sakrum, koksiks ve hyoid kemiklerden oluşur [42]. Sağlıklı bir

insan vücuduna ait iskelet sistemi ve bu yapıyı oluşturan kemikler Şekil 2.1'de gösterilmektedir [43].



Şekil 2.1 Sağlıklı bir insan vücuduna ait iskelet sistemi [43]

Genel olarak tüm kemik dokular, kortikal (kompakt) ve kanselöz (süngerimsi-trabeküler) dokular olarak adlandırılan farklı özelliklere ve görünüşe sahip yapılardan meydana gelmektedir. Yetişkin insan iskeletinin %80'i kortikal kemikten ve kalan %20'si ise trabeküler kemikten oluşur [44]. Fonksiyonel olarak, kortikal kemik mekanik dayanım ve koruyucu tabaka olma gibi yapısal işlevlere sahipken trabeküler kemik serum mineral homeostazını korumada rol oynar. Bu durum geniş yüzey alanına sahip trabeküler dokunun, kemik iliği ile daha fazla etkileşimde olarak metabolik aktivitesinin daha yüksek olmasının bir sonucudur [45].

Kortikal kemik %5-15 arası gözenekliliğe sahipken, süngerimsi kemikte bu oran %40-95 arasındadır. Ayrıca, kortikal/trabeküler kemik oranı her bir kemiğin türüne göre farklılık göstermektedir. Örneğin hem uzun hem de düz kemikler ağırlıklı olarak yoğun ve sert bir doku olan kortikal kemikten (korteks) meydana gelir.

Korteksin iç kısmında ise hematopoietik elementler ve yağ içeren kemik iliği boşluğu ve az miktarda süngerimsi kemik doku bulunur. Femur ve tibia gibi uzun kemiklerin uçları ve omurlar gibi düz ve düzensiz kemikler ise ağırlıklı olarak süngerimsi kemik dokudan oluşmaktadır [46]. Böylece çeşitli kemik türlerinde yoğunluk, porozite, sertlik gibi özellikler ve bunlara bağlı olarak sergiledikleri mekanik davranışlar değişmektedir.

Kısaca tanımlamak gerekirse, iskelet sistemini oluşturan kemik doku yapısında bulundurduğu CaP'nin mekanik dayanım, sertlik ve basma yüklerine karşı yüksek direnci ile kolajenin elastikiyeti ve gerilme direnci özelliklerini bir arada bulunduran kompozit bir yapıdır. Bu sayede ortalama değerler incelendiğinde; kortikal kemik dokunun Young elastisite modülü E= 7–30 GPa, gerilme mukavemeti 50–150 MPa, basınç mukavemeti 167–193 MPa, gerinme yüzdesi % 1–3 ve kırılma tokluğu ise K_{1C}= 2–12 MPa.$m^{1/2}$ ve süngerimsi kemiğin Young elastisite modülü E= 0,05-0,5 GPa, gerilme mukavemeti 1,2–20 MPa, basınç mukavemeti 1,9–10 MPa, gerinme yüzdesi %5–7 ve kırılma tokluğu ise K_{1C}= 0,1 MPa.$m^{1/2}$ olarak belirlenmektedir [20], [47].

Yapısal farklara ek olarak uygulanan yükün yönü, kütle, yaşlanma ve çeşitli travmalar da kemik dokunun mekanik davranışını ve kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir [48]. Genellikle olgunlaşma ile gerilme mukavemeti ve femoral kortikal kemik elastiklik modülünün on yılda yaklaşık olarak %2 azaldığı bilinmektedir. Yıllara bağlı olarak değişen insan femur kortikal kemiğinin maksimum gerilme dayanımı ve maksimum gerinim yüzdeleri Tablo 2.1'de gösterilmektedir [49].

Tablo 2.1 İnsan femur kortikal kemiğine ait mekanik özellikler [49]

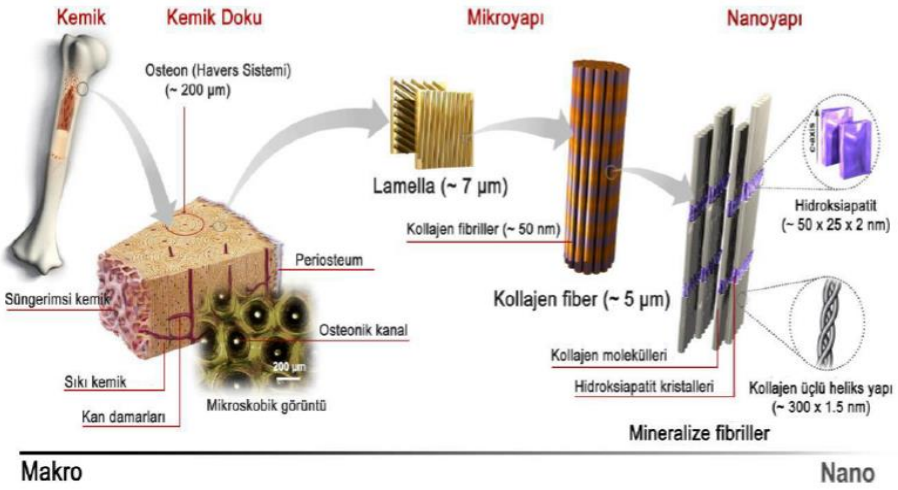
Özellik	Yaş (Yıl)						
	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80
Maksimum Gerilme Dayanımı (MPa)							
Germe	114	123	120	112	93	86	86
Basma	-	167	167	161	155	145	-
Bükme	151	173	173	162	154	139	139
Burma	-	57	57	52	52	49	49
Maksimum Gerinim (%)							
Germe	1.5	1.4	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3
Basma	-	1.9	1.8	1.8	1.8	1.8	-
Burma	-	2.8	2.8	2.5	2.5	2.7	2.7

2.2 Kemik Doku

2.2.1 Kemik Matrisi

Sağlıklı bir insan kemiğinin hücre dışı matrisi (extracellular matrix) ortalama %25 su, %30 organik ve %45 inorganik yapıdan oluşmaktadır [38]. Mineralize matris (osteoid) yapısında olan organik kısım büyük oranda Tip I kolajen fibrillerinden oluşurken, demineralize inorganik kısım ise nano yapılı hidroksiapatit kristallerinden [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] meydana gelmektedir [50]. Yapının içerisinde polimer matris ve mineral bileşenler fiziksel olarak birbirlerine kenetlenmekte ve ayrıca birçok zayıf kimyasal bağlar ve özellikle hidrojen bağları ile etkileşmektedir. Hidrojen bağları, kemik bileşenleri arasında oldukça önemli bir etkileşim türüdür. Kemik doku, HAp gibi biyominerallerle takviye edilmiş ve özellikle kolajen Tip 1 gibi kovalent olarak çapraz bağlanmış bir biyopolimer matristen oluşan anizotropik bir bileşim olarak da tanımlanabilir [51]. Kolajen fibriller kemik yapısına elastiklik

kazandırırken, nanohidroksiapatit yapı ise mekanik dayanım sağlar. Bu iki özelliğin bir arada bulunması ile kemik doku farklı mekanik kuvvetler altında hareket edebilme ve değişen stres faktörlerine uyum gösterebilme yeteneği kazanır. Kemiğin makro boyuttan nano boyuta hiyerarşik yapısı Şekil 2.2'de gösterilmektedir [52].



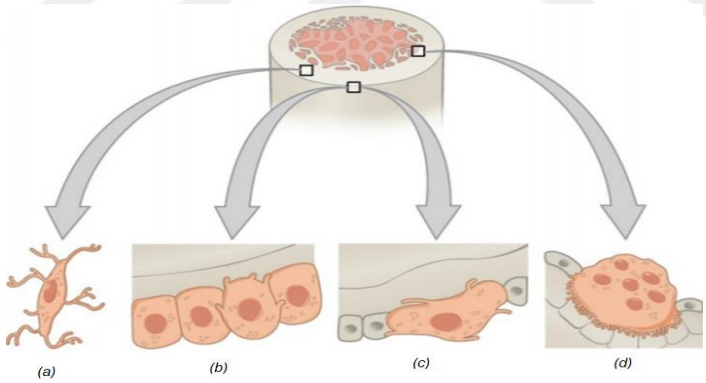
Şekil 2.2 Kemiğin hiyerarşik yapısı [52]

Organik faz kemik dokunun yapısını, mekanik ve biyokimyasal özelliklerini belirlemede önemli rol oynamaktadır. Bu yapının yaklaşık %90'ı Tip I ve az miktarda Tip III, V, X ve XII kolajenlerden oluşmaktadır [44]. Kolajen, yaklaşık olarak 1000 aminoasitten oluşan, ortalama 300 nanometre uzunluğunda, ip benzeri yapıya sahip lifli bir proteindir. Polipeptit zincirlerin üçlü sarmal yapı oluşturacak şekilde birleşmesiyle prokolajen molekülleri oluşmaktadır [53]. Osteoblast hücreleri tarafından salgılanan prokolajen moleküllerinin bir araya gelmesiyle kolajen fibrilleri, bu yapıların gruplanmasıyla da kolajen fiberler meydana gelmektedir [54]. Organik matris, içerdiği kolajenlere ek olarak hücre ve mineral bağlanması, hücre farklılaşması, çekirdeklenme ve kristal büyümesinde görev alan kolajen olmayan proteinler de içermektedir. Bu yapılara örnek olarak; glikozaminoglikanlar (kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hiyaluronik asit), glikoproteinler (osteonektin, osteokalsin, osteopontin ve kemik sialoproteini), sitokinler (interlökin 1 ve 6) ile çeşitli büyüme faktörleri (dönüştürücü büyüme faktörleri, koloni uyarıcı faktörler,

trombosit kaynaklı büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü 1 ve 2) verilebilir. Kolajen fiberler arasında konumlanmış inorganik fazın ise büyük çoğunluğu HAp'dan meydana gelmekle birlikte magnezyum, stronsiyum, sodyum, potasyum, klorür ve florür gibi diğer iyonları da içermektedir. Bu impüriteler HAp kristalliğini azaltarak çözünürlüğünü etkiler. Böylece kemik doku mineral dengesi ve kemik adaptasyonu sağlama özelliği kazanır [42], [55]. Ayrıca tüm yapısal özelliklerine ek olarak, kalsifiye olmuş kemik matrisi içerisinde gömülü olarak bulunan ve yeniden yapılanma mekanizmasının lokal aktivasyonunda da kritik rol oynadığı düşünülen osteosit hücreleri sayesinde "canlı ve inert olmayan" bir doku olarak tanımlanmaktadır [45].

2.2.2 Kemik Hücrelerinin Morfolojisi

Kemik dokunun yapımında ve yeniden yapılanmasında görev alan çeşitli hücre tipleri bulunmaktadır. Bu hücreler sırasıyla, osteoprojenitör hücreler (öncül osteoblastlar), osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar olarak sınıflandırılmaktadır. Kemik dokunun yapım ve yıkımında görev alan hücreler Şekil 2.3'te gösterilmektedir [56].



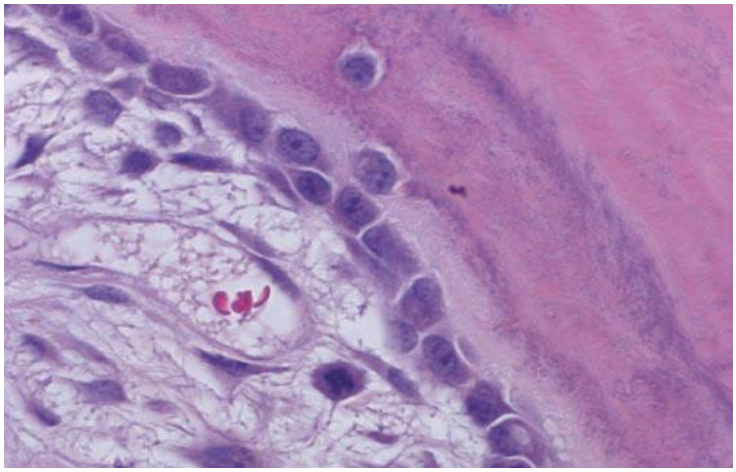
Şekil 2.3 Kemik dokunun yapım ve yıkımında görev alan hücreler [56]

a) Osteosit hücreleri; kemik dokuyu korur. b) Osteoblast hücreleri; kemik matrisini oluşturur. c) Osteojenik hücreler; kök hücre olarak tanımlanır. d) Osteoklast hücreleri; kemik yıkımını sağlar.

Osteoklast hücreleri kemik iliğinin hemopoietik hücrelerinin farklılaşması sonucu oluşurken diğer kemik hücreleri kemik iliğinin mezenkimal kökenli hücrelerinin

farklılaşması ile meydana gelmektedir [57]. Osteoblast, osteoklast ve kemik yüzeyini koruyucu bir tabaka oluşturmak için osteoblast hücrelerinin düzleşmesiyle meydana gelen kemik astar hücreleri kemik yüzeyinde konumlanırken, osteosit hücreleri kemiğin iç kısmında yer almaktadır [58]. Osteoprojenitörler, uyarıcıya veya yerel mikro çevreye bağlı olarak osteoblastlara, kondroblastlara, kemik iliği stromal hücrelerine veya fibroblastlara ayrılma potansiyeline sahip hücrelerdir. Bir başka deyişle kemik hücresi oluşturmak için şartlanmış mezenkim hücreleri olarak da tanımlanabilirler. Başlatıcı görevi gören bu öncül hücreler periosteum, endosteum ve havers kanallarında gerekli durumlarda osteoblastlara farklılaşmak üzere hazır durumda bulunurlar. Böylece büyüme ve kırık iyileşmesi dönemlerinde mitoz bölünme yoluyla osteoblastlara dönüşerek kemik matriksinin sentezlenmesini sağlarlar [59].

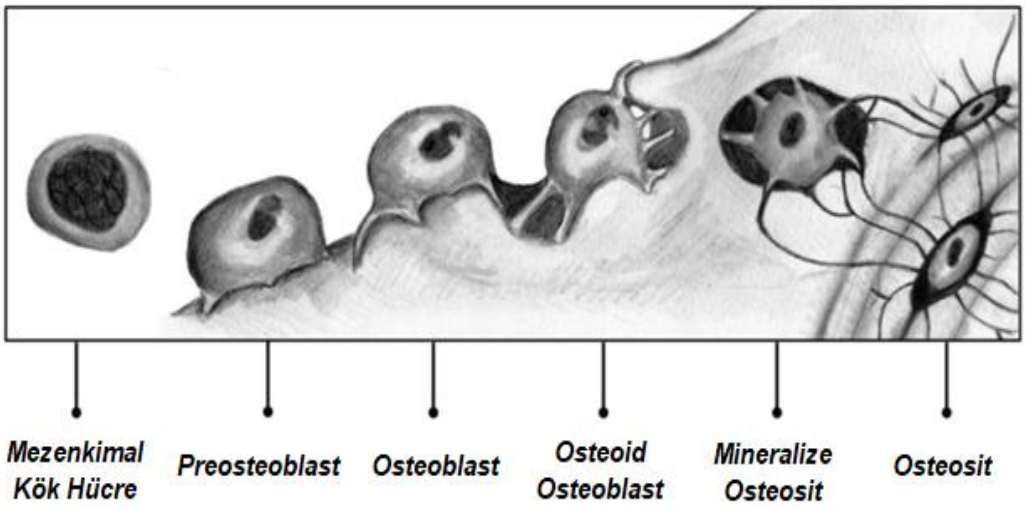
Osteoblast hücrelerin başlıca görevleri kemik oluşumu, büyümesi ve yeniden yapılanmasını sağlamak olarak ifade edilebilir [60]. Kemik doku sürekli olarak mekanik streslerin etkisi altında kalmaktadır. Büyük ve karmaşık osteoblastik hücre ağı, çevresindeki biyokimyasal ortama ve oluşan streslere son derece duyarlıdır. Şartlara bağlı olarak kemik boyutu ve şeklindeki değişiklikleri oluşturmak amacıyla kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların matrise girip çıkma hareketlerini kontrol ederek mekanik uyaranlara karşı bir cevap oluştururlar [61]. Kübik veya silindirik şekle sahip olabilen osteoblast hücrelerine ait görüntü Şekil 2.4'te verilmektedir [40].



Şekil 2.4 Kemik yapımından sorumlu olan osteoblast hücreleri [40]

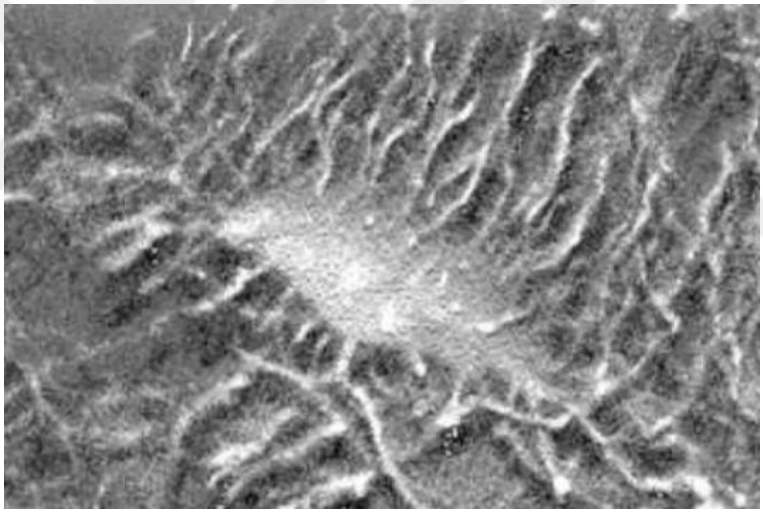
Bu hücrelerin fenotipi ve morfolojik özellikleri, gelişim ve farklılaşma aşamalarına bağlıdır. Aktif osteoblast hücreleri yapısında endoplazmik retikulum, mitokondri, golgi cisimciği ve ayrıca mikrotüpler, mikrofilamentler, lizozomlar, glikojen ve lipitler bulundurmaktadır. Tek çekirdeği, hücrenin merkezinde konumlanmıştır [62]. Kolajen Tip I, glikozaminoglikanlar, osteokalsin, osteopontin, kemik siyaloprotein ve osteonektin gibi çeşitli kolajen olmayan proteinler, bazı sitokinler, büyüme faktörü-beta (TGF-β), kemik morfojenik proteinleri (BMP) ve alkalin fosfataz gibi enzimler osteoblast hücreleri tarafından salgılanmaktadır [41].

Osteoblastlar, "osteoid" adı verilen kolajen lifleri ve matris proteinlerinden oluşan dokuyu üreterek kemik matrisinin sentezlenmesi, biriktirilmesi ve mineralleştirilmesinde önemli rol oynarlar. Bu durum sitoplazmalarında bolca bulunan alkalin fosfataz enziminin, kalsiyumun kalsiyum fosfat olarak matrise çökmesini ve böylece matrisin kalsifikasyonunu sağlaması sonucu oluşmaktadır. Kalsifikasyon işlemi sonrası faaliyetleri azalan osteoblast hücreleri osteosit hücrelerine farklılaşarak matris içerisinde gömülü bir şekilde konumlanırlar [52]. Osteoblast hücrelerinin osteosit hücrelerine farklılaşması Şekil 2.5'te verilmektedir [63].



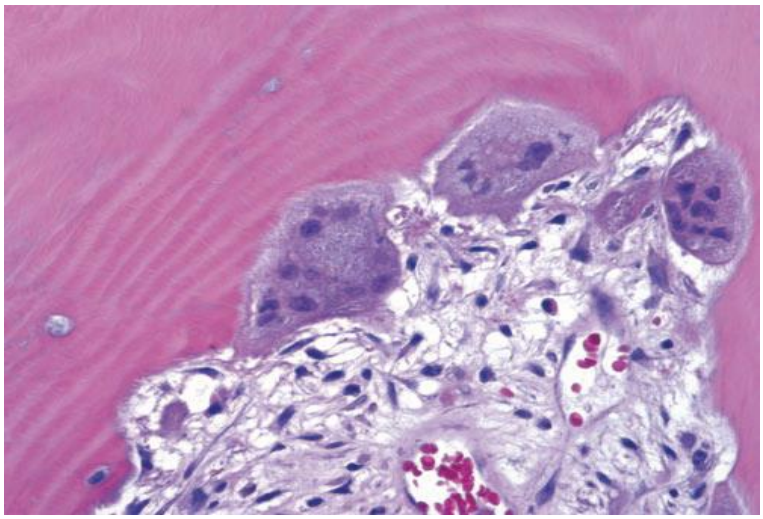
Şekil 2.5 Osteoblast hücrelerinin osteosit hücrelerine farklılaşması [63]

Kemik hücrelerinin büyük çoğunluğu osteosit hücrelerinden oluşmaktadır. Mineralize olmuş kemik matrisinde lakuna adı verilen boşluklarda bulunan inaktif osteoblast hücreleri olarak da tanımlanabilirler. Osteositlerin kemik içerisindeki dağılımı, adaptasyonu arttırmak için özel olarak organize edilmiş üç boyutlu bir matristir [63]. Gelişmekte olan osteosit hücrelerinde, organellerin yapısı niteliksel olarak osteoblastlarınkine benzer olup organellerin boyutları ve sayıları azalmaktadır. Sahip oldukları sitoplazmik uzantıları ile yıldız şeklinde bir morfolojiye sahiptirler. Bu uzantılar sayesinde diğer kemik hücreleri ile bağlantı kurabilme, besin maddeleri ve kalsitonin, paratiroid gibi hormonları içeren doku sıvılarının taşınımı, mekanik ve biyokimyasal sinyallerin iletimi gibi önemli işlevlere sahiptirler. Böylece kemik dokunun canlı kalabilmesini sağlarlar [64]. Bölünme yetenekleri ise bulunmamaktadır. Gelişmiş bir osteosit hücresine ait görüntü Şekil 2.6'da verilmektedir [64].



Şekil 2.6 Gelişmiş bir osteosit hücresi [64]

Kemik yapım ve yıkım döngüsünde kemik oluşumu mezenkimal soydan türetilmiş osteoblast hücrelerinin kontrolündeyken, dengeli bir döngüde kemik dokunun yıkımı ise monosit/makrofaj hematopoietik kökenli osteoklast hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Bu sayede kemik dokunun kalsiyum dengesi sağlanmaktadır [65]. Kemik yıkımında uzmanlaşan çok çekirdekli osteoklast hücrelerine ait görüntü Şekil 2.7'de verilmektedir [40].



Şekil 2.7 Kemik yıkımından sorumlu olan osteoklastlar hücreleri [40]

Osteoklastlar, kemik matrisine yapışarak salgıladıkları asit ve litik enzimleri sayesinde özel hücre dışı bir bölmede kemik rezorpsiyonunu sağlamaktadırlar [66]. Bu durum hidrojen (H^+) iyonlarının ve katepsin K enziminin osteoklast tarafından sentezi ile gerçekleşir. H^+ iyonları kemik matrisinin mineral bileşenini çözmek için osteoklast hücrelerindeki rezorpsiyon bölmesini asitleştirirken, katepsin K enzimi ise çoğunlukla Tip I kolajenden oluşan proteinli matrisi rezorbe etmektedir [42].

2.3 Kemik Modelleme

İnsan iskeleti, mezodermal germ tabakasının (embriyonik birincil hücre katmanı) oluşumundan kısa bir süre sonra gelişmeye başlar. Bu yapıyı oluşturan çeşitli kemik türleri sadece genel anatomileriyle değil aynı zamanda gelişim mekanizmaları ile de farklılık göstermektedirler. Kemik oluşumu, embriyonik gelişim sırasında osteokondral projenitör olarak adlandırılan mezenkimal hücrelerin çoğalarak iskelet oluşum bölgelerine göç etmeleri ve burada yoğunlaşarak farklılaşmaları sonucu meydana gelmektedir. Kemik metabolizması temel olarak D vitamini, parathormon ve kalsitonin tarafından düzenlenmektedir. İskelet sistemini oluşturan kemik doku intramembranöz ossifikasyon (kemikleşme) ve endokondral ossifikasyon olarak adlandırılan iki farklı gelişimsel mekanizma sayesinde oluşturulmaktadır [67].

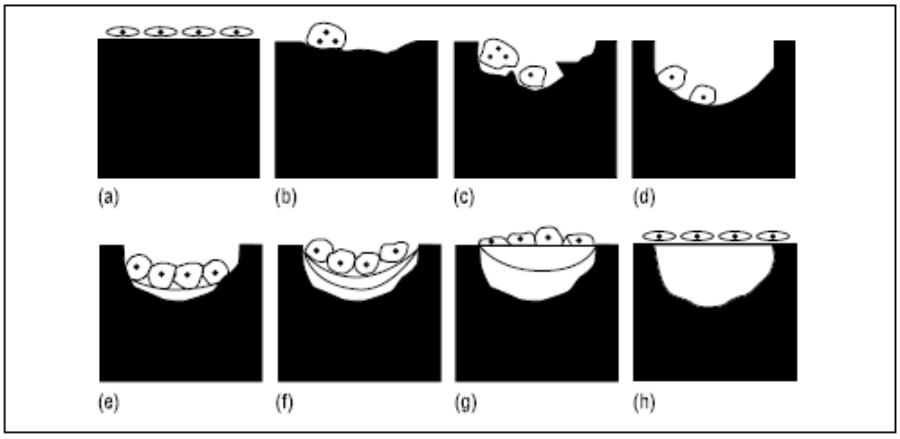
Anne karnında yaklaşık olarak üçüncü hafta itibari ile başlayan ve kemik oluşumu ile sonuçlanan bu süreçler "modelleme" olarak da isimlendirilmektedir. Her iki kemikleşme türü de öncelikle primer ve olgunlaşmamış dokular meydana getirmektedir. Kemik ilk olarak, kolajen fibrillerin rastgele yönlendirildiği olgunlaşmamış örgü kemik (woven bone) yapısındadır. Örgü kemik doku olarak adlandırılan primer kemikler geçicidir. Bu yapı daha sonra osteoklastlar tarafından rezorbe edilir ve yerine osteoblastlar tarafından kolajen liflerin belirli bir düzen içerisinde bulunduğu lamellar kemik doku oluşturulur. Böylece minimum kütle ile maksimum mukavemet sağlayan yönlendirilmiş tip 1 kolajen fibrillere sahip kalıcı kemik doku meydana getirilir [45].

Bu iki prosesteki temel fark; intramembranöz ossifikasyon sırasında membranöz dokuları oluşturmak için osteokondral progenitörler farklılaşarak osteoblastlara dönüşmektedir [58]. Örneğin kafatasında bulunan yassı kemiklerin oluşumu, kısa kemiklerin büyümesi ve uzun kemiklerin kalınlaşması bu sayede gerçekleşmektedir. Endokondral ossifikasyonda ise hücreler, ileride meydana gelecek olgunlaşmış kısa ve uzun kemiklerin hiyalin kıkırdak şablonunu oluşturmak için, kondrositlere dönüşmektedirler [68]. Böylece bu iki temel mekanizma sayesinde normal koşullarda iskelet sistemini oluşturan 206 adet farklı şekil, boyut ve fonksiyona sahip kemik meydana getirilmektedir [69].

2.4 Yeniden Yapılandırma (Remodelling)

Yetişkinlerde genetik faktörlere de bağlı olarak gelişimini tamamlamış olan kemik boyutlarında bir artış veya azalış olmaz ancak kemik doku devamlı olarak yıkılmakta ve yeniden yapılandırılmaktadır (remodelling) [70]. Embriyonik evrede başlayan kemik gelişimi belirli ölçü ve boyuta ulaşana kadar büyüme hormonu gibi etkenler kontrolünde devam etmektedir. Bu süreç daha sonra yerini ömür boyu sürecek olan, bir takım kimyasal ve biyolojik mekanizmalar kontrolündeki yeniden yapılandırmaya bırakır [71]. Yeniden yapılandırma döngüsünde kemiği rezorbe eden osteoklast hücrelerinin aktivitesi, kemik dokuyu sentezleyen osteoblast hücrelerinin aktivitesine eşittir. Bu sayede yapım ve yıkım evreleri sağlıklı bir döngüde sürekli olarak birbirlerini takip eder. Böylece normal koşullar altında

yaşam boyunca iskelet homeostazı sağlanmış olunur. Kemiğin yapım-yıkım döngüsü Şekil 2.8'de gösterilmektedir [72].



Şekil 2.8 Trabeküler kemikte yapım-yıkım döngüsü [72]

Kemik yeniden yapılanması; sitokinler, kemokinler, hormonlar ve çeşitli faktörler tarafından düzenlenmektedir [73]. Bu döngünün başlangıcı olan dinlenme fazında (a), yüzeyi korumak amacıyla düzleşen osteoblastlar tarafından oluşturulan kemik astar hücreleri, kemik yüzeyinde konumlanmaktadır. Bu süreci osteoklastların kemik yıkım alanına fokal çekimiyle (b) birlikte kemik rezorpsiyonunun aktivasyonu takip etmektedir. Böylece rezorpsiyon kavitesi oluşturulmaktadır (c). Ardından mononükleer hücrelerin erozyon kavitesini düzgün hale getirmesi (geri dönüşüm) ve burada osteoblastların farklılaşması (coupling) meydana gelmektedir (d). Osteoblastların aktiviteleri sonucu matris sentezi ve mineralizasyon (e) başlamaktadır. Matris sentezinin (f) tamamlanmasının ardından kemik yüzeyi yeniden astar hücreleri ile kaplanmakta (g) ve yapım-yıkım döngüsü tamamlanmaktadır (h) [72]. Böylece kemik doku sahip olduğu biyolojik yeniden şekillenme sayesinde, uygulanan mekanik yüklere bağlı olarak kütlesini, şeklini ve özelliklerini değiştirirek kendini onarma ve adaptasyon becerisi kazanmaktadır.

3
KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE UYGULAMALARI

3.1 Doku Mühendisliğine Giriş

Günümüzde kullanılan ileri teknolojiler ve gelişen medikal çalışmalarla beraber, ortalama yaşam süresinde de önemli bir artış meydana gelmektedir. Bununla beraber uzun ömürlülük, yaşa bağlı hastalıklar ve yaşam kalitesinde azalma gibi istenmeyen sonuçlara neden olabilmektedir. Böylece, bireylerin hem psikolojik hem de sosyo-ekonomik olarak etkilendiği bir süreç oluşmaktadır [74]. Organ nakli, yapay protez, ilaç tedavileri ve çeşitli cerrahi müdahaleler ile tedavi edilmeye çalışılan doku ve organ yetmezlikleri, tıbbi olarak sıkça karşılaşılan ciddi durumlardır [75].

Doku mühendisliği; yaşlanma, kaza, osteoporoz, romatizmal hastalıklar, doğuştan gelen anomaliler, artan obezite ve azalan fiziksel aktiviteler gibi sayısız sebeple oluşabilen hasarlı doku ve organların yeniden yapılandırılması için kullanılabilecek, malzeme ve hücre nakli prensiplerini birleştiren fonksiyonel doku ikameleri geliştirmeyi amaçlamaktadır. Başlıca uygulama alanları; deri, kemik, kıkırdak doku, solunum sistemi, karaciğer, kalp ve damarlardır. Bu yaklaşım başlangıçta; ototransplantasyon yönteminde kullanılabilir dokuların sınırlı olması, allotransplantasyonda nakil bekleyen hasta sayısına karşılık organ bağışlarının yetersiz kalması, ksenotransplantasyon sırasında karşılaşılan immün sistem cevabı gibi istenmeyen durumları gidermek amacıyla oluşturulmuştur [76]. Bu ihtiyacın uluslararası düzeyde de artması sebebiyle doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında yapılan çalışmalar günümüzde de devam etmektedir [77]. Böylece normal dokuyu taklit eden, doku işlevlerini eski haline getiren, sürdüren veya geliştiren yapılar oluşturarak yeni bir tedavi alternatifi sunulmaktadır [78].

Genel olarak tüm doku mühendisliği uygulamaları; mühendislik, kimya, biyoloji, matematik, malzeme bilgisi, in vivo/in vitro ortam ve tüm bileşenlerine hâkimiyet ve klinisyenlerin bakış açısı gibi disiplilerarası bilgi birikimini gerektirmektedir [79].

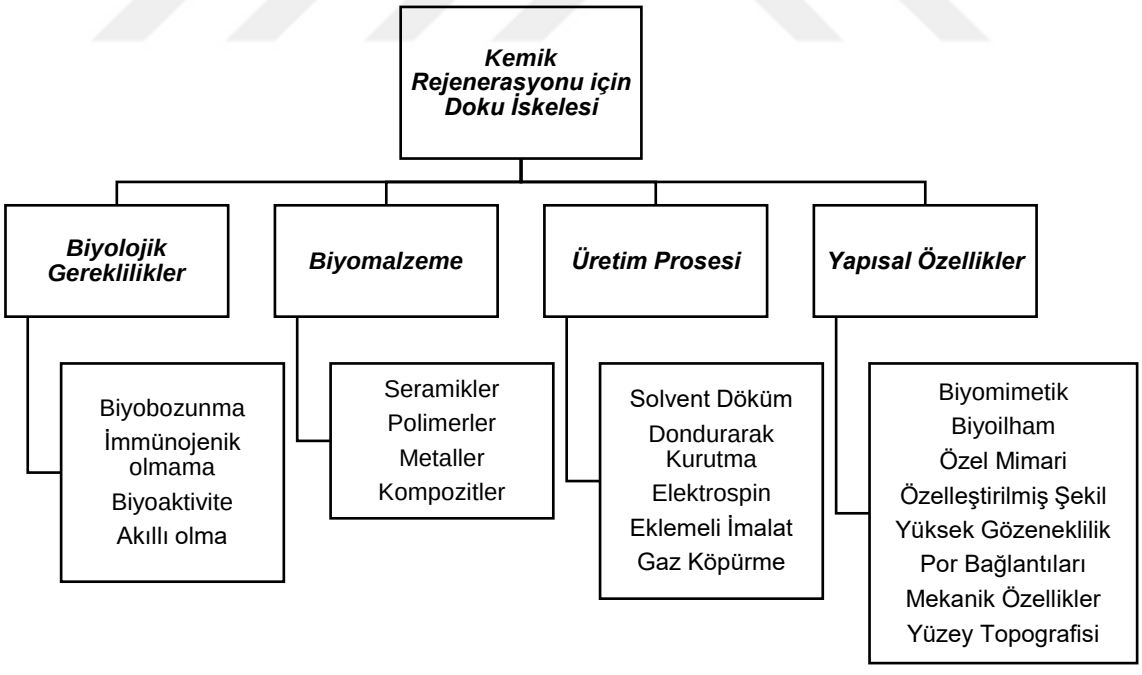
3.1.1 Kemik Doku Mühendisliği Uygulamalarında Temel Kavramlar

Kemik doku kendini iyileştirme ve yeniden yapılandırma mekanizmalarına sahip olsa da sağlıklı rejenerasyon döngüsü bazı durumlarda tam olarak gerçekleşememektedir. Çeşitli hastalıklar, travmalar, tümörler, yaşlanma, konjenital deformite (doğuşsal anormallikler) gibi dokunun metabolik faaliyetlerini de bozan nedenlerle oluşan büyük defektler ve çok parçalı kırıklarda, yeniden yapılanma mekanizması yetersiz kalabilmektedir [80]. Bu durumlarda hasta doku bölgelerinde yerel farklılaşmalar, deformasyonlar ve fonksiyonel bozuklukların oluşması ile iskelet sisteminin de kısmen ya da tamemen etkilendiği bir süreç meydana gelmektedir. Böylece kemik doku hasarları ve kayıpları hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir. Kemik doku mühendisliği uygulamaları doku iskelesi, hücre ve biyokimyasal sinyal bileşenlerini kullanarak kaybedilen dokuların ve fonksiyonlarının yeniden kazandırılmasını hedeflemektedir.

İdeal doku iskelelerinin üretilebilmesi için öncelikle biyouyumluluk, osteogenez, osteointegrasyon, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon kavramları anlaşılmalıdır. Bunlara ek olarak kullanılan malzemenin yeterli mekanik özelliklere sahip olması, toksisite, biyobozunurluk, gözenek boyutu ve dağılımı gibi önemli parametreler de bulunmaktadır. İdeal bir kemik doku üretiminde incelenmesi gereken bazı parametreler Şekil 3.1'de gösterilmektedir [81].

Biyouyumluluk kavramı hasarlı bölgeye yerleştirilen malzeme ile konak bölge arasındaki uyumu ifade etmektedir. Canlı organizmalardan oluşan biyolojik dokunun, canlı olmayan veya aktif materyallere karşı oluşturduğu cevap olarak da tanımlanabilir. Biyouyumluluk içerisinde biyolojik açıdan güvenli olma (biyogüvenlik) ve vücut fonksiyonlarının desteklenmesi (biyofonksiyon) kavramlarını da barındırmaktadır. İdeal bir kemik iskele malzemesi yüksek

biyouyumluluk özelliğine sahip olmalıdır [82]. **Osteointegrasyon,** uygulanan implantın doku ile kaynaşması ve bütünleşmesi anlamlarını taşımaktadır. Bu sayede implant ve doğrudan temas ettiği doku bir bütün olarak hareket etmekte ve böylece protezin uzun süreli stabilitesi sağlanmaktadır [83]. **Osteokondüksiyon,** implante edilmiş materyalin iskele görevi görerek yüzeyinde kemik oluşumu ve gelişimine olanak sağlamasıdır. Bu özellik, osteoblast hücrelerinin materyal yüzeyine yapışarak çoğalmasını sağlamakta ve rejenerasyonu teşvik etmektedir. Materyalin yüzey topografisi, por boyut ve dağılımı ve biyouyumluluk osteokondüktif özelliği etkilemektedir. **Osteoindüksiyon** ise genellikle pluri- veya multipotent mezenkimal kök hücrelerinin belirli bir bölgeye toplanarak burada erken evre preosteoblastlarına farklılaşması sürecidir. Bu proses, kemik morfojenik proteinleri ve fibroblast büyüme faktörleri gibi büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kontrolünde gerçekleşerek kalsiyum ve fosfat gibi iyonların lokal birikimi ile sonuçlanmaktadır [84]. **Osteogenez** kavramı ise tüm bu biyolojik etkileşimler kontrolünde meydana gelen kemik gelişimi ve oluşumu sürecini tanımlamaktadır [85].



Şekil 3.1 İdeal bir kemik doku üretiminde incelenmesi gereken parametreler [81]

Kemik rejenerasyonunda hücre taşıyıcısı olacak ve doku desteği sağlayacak optimum özelliklere sahip yapılar bu kavram ve parametreler çerçevesinde geliştirilmelidir.

3.1.1.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Doku iskeleleri ortopedi, kraniyofasiyal, maksillofasiyal cerrahi ve diş hekimliği gibi klinik uygulamalarda sıkça tercih edilmektedir. Hasarlı bölgeye yerleştirilen metaller, sentetik ve doğal polimerler, seramikler ve kompozit esaslı malzemeler ile doku onarımı sağlanmaktadır. İmplant tedavilerinde paslanmaz çelik, nikel, kobalt ve titanyum alaşımları gibi çeşitli **metalik iskeleler** kullanılmaktadır. Bu yapılar oldukça yüksek mekanik dayanım değerlerine sahiptirler. Buna karşın, biyouyumluluğu azaltan biyolojik olarak tanınmama, doku yapışması eksikliği, düşük bozunma oranları ve toksik metalik iyon salımı gibi dezavantajları, metallerin kullanımını oldukça kısıtlamaktadır. Seramik veya polimerik malzemeler ile yüzey kaplama ve modifikasyon işlemleri sayesinde hücresel davranışlar ve biyolojik süreçler etkilenerek bu sorunun üstesinden gelinebilmektedir [86].

Günümüzde, metalik yığın fazın yanında parçacık kaplamaları ile gözenekli yüzeyler oluşturulmaktadır. Örneğin; imalat tekniğine bağlı olarak çeşitli nanometre değerlerinden mikrometre değerlerine kadar değişen kaplama kalınlıklarına sahip gözenekli titanyum oksit (TiO_2) yüzeyler elde edilmektedir. Geliştirilen biyofilm kaplamalar; monodispers, üç boyutlu, küresel ve birbirleri ile bağlantılı porlardan oluşmaktadır. Kaplanan oksit tabakasının kalınlığı, kimyasal özellikleri, yapısı, morfolojisi ve pürüzlülüğü; kemik hücrelerinin büyüme hızını, düzenlenmesini ve fonksiyonel protein üretimini etkilemektedir [87]. Böylece, bu ve benzeri uygulamalar sayesinde, diş ve ortopedik protezlerin daha uzun süreli klinik fonksiyonlara ve biyouyumluluğa sahip olması mümkün olmaktadır.

Polimerik malzemeler, implantasyon sonrası enzimatik/hücresel yollarla rezorbe olabilme, elastisite, kolay şekillendirilebilme ve biyouyumluluk gibi özellikleri sebebiyle doku iskelesi üretiminde tercih edilmektedir [88]. Polimerik malzemeler doğal ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan

doğal polimerler polisakkaritler (kitosan, aljinat ve hiyalüronik asit) ve proteinlerden (kolajen, jelatin ve elastin) oluşurken, sentetik polimerler alifatik (α-hidroksi) poliesterler, poli(glikolik asit), poli(L-laktik asit) ve bunların kopolimerleri olan poli(ε-kaprolakton) ve poliüretanlardan oluşmaktadır.

Bununla birlikte, bazı doğal polimerlerin zayıf mekanik özellikleri ve yüksek biyobozunma hızları, bazı sentetik polimerlerinse kontrol edilemeyen bozunma ve biyoinert davranış sergileyebilme gibi özellikleri sebebiyle çeşitli kimyasal modifikasyonlar ile geliştirilmeleri gerekmektedir. Elde edilen hidrojeller doğal veya sentetik esaslı polimerik ağlardan oluşan, yapılarındaki suyu emme ve tutma özelliklerine sahip çapraz bağlı yapılardır [89]. Geliştirilen bu ağlar sayesinde ayarlanabilir mekanik özellikler ve kontrol edilebilir bozunma davranışına sahip üç boyutlu matrisler oluşturmak mümkündür. Ayrıca; bu yapılar doku rejenerasyonunu desteklemek amacıyla hücre canlılığına yardımcı olacak biyolojik materyallerle de modifiye edilebilmektedir [90]. Böylece, hücre dışı matrise olan benzerlikleri, biyoaktif molekülleri taşıma kapasiteleri ve biyobozunur olmaları sebebiyle bazı klinik uygulamalarda tercih edilmektedirler [91].

Osteogenezi sağlamak amacıyla **seramik esaslı** implantlar/iskeleler ve özellikle de insan vücudunun inorganik bileşeni olan HAp sıkça tercih edilmektedir. Buna ek olarak, trikalsiyum fosfat (TCP) esaslı iskeleler de kemik rejenerasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, HAp ve TCP'lerin kombinasyonları ile elde edilen bifazik doku iskeleleri de mevcuttur. Yüksek mekanik dayanım, biyouyumluluk, hücre farklılaşmasına olanak sağlama ve doğal kemiğin mineral fazına yapısal benzerlikleri gibi özellikleri biyoseramiklere olan ilgiyi arttırmaktadır. Seramik esaslı biyomalzemeler genel olarak, yüzeylerinde kemik apatit-benzeri yapılar veya karbonat hidroksiapatit oluşturabilme ve doğal kemik gibi sitokinleri bağlayabilme kabiliyetine sahiptirler [92]. Böylece, geliştirilen doku iskeleleri osteointegrasyonu sağlayabilmektedir.

Günümüzde, diş ve ortopedik cerrahide kemik defektlerini doldurma veya kemik dokuyla implantın entegrasyonunu arttırmak amacıyla metal yüzeyleri seramik malzemelerle kaplama uygulamaları oldukça yaygındır. Seramik doku iskelelerinin

üretimi genellikle seramik tozunun yüksek sıcaklıklarda sinterlenmesini esas alan imalat tekniklerine dayanmaktadır. Bu yöntem ile üretilen iskelelerin tamamen birbirleri ile bağlantılı porlara, > %50 por oranına, yeterli basma ve üç noktadan eğme mukavemetine sahip olduğu görülmektedir [93]. Mevcut avantajlarının yanında; yüksek kırılganlık, zor şekillendirilme ve kontrol edilemeyen biyobozunma davranışları nedeniyle polimerik malzemeler ile kullanılarak mekanik özelliklerin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada geliştirilen hidroksiapatit/poli(ε-kaprolakton) kompozitin artan polimer oranıyla, basma dayanımını 0,16 MPa' dan maksimum 0,45 MPa'ya ve elastiklik modülünü ise 0,79 MPa' dan maksimum 1,43 MPa' ya yükselttiği görülmektedir [94].

Kompozit malzemeler; seramiklerin, metallerin, doğal polimerlerin ve sentetik polimerlerin farklı kombinasyonlardan oluşabilmektedir. Kullanılan malzeme türlerine bağlı olarak doku iskelesinin sahip olduğu özellikler de değişkenlik göstermektedir. Örneğin; kompozit doku iskelesini oluşturan polimerik faz yapıya tokluk kazandırırken, biyoaktiviteye sahip inorganik seramik faz ise mekanik özellikleri ve bozunma davranışı belirlemektedir. Böylece elde edilen kompozit yapılar, kemiğin doğal yapısına da benzemekte olup konak dokunun gerektirdiği mekanik ve fizikokimyasal özellikleri de (sertlik, biyobozunma, yüzey kimyası gibi) karşılamaktadır. [95]. Bununla birlikte, doku iskelelerinin sahip olması istenilen gözeneklilik oranları da kullanılan malzemelerin oranları optimize edilerek belirlenebilmektedir. Doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli biyomalzemelerin uygulama alanları, avantaj ve dezavantajları Tablo 3.1'de verilmektedir [96], [97], [98].

Tablo 3.1 Doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli biyomalzemelerin avantaj ve dezavantajları [96], [97], [98]

MALZEMENİN TÜRÜ	**AVANTAJLAR**	**DEZAVANTAJLAR**	**UYGULAMA ALANI**
METALLER ve ALAŞIMLARI			
Titanyum ve Alaşımları **Nikel ve Alaşımları** **Paslanmaz Çelik** **Kobalt- Krom Alaşımları**	Biyouyumluluk Yüksek mukavemet Toksik olmama Korozyon dayanımı	Biyobozunur olmama Yoğun	Kemik plak ve implantları, Dental ark teli ve braketler
BİYOSERAMİKLER			
Biyoaktif Camlar **Hidroksiapatit** **Trikalsiyum Fosfat**	Farklılaşma ve osteogenezi destekleme Biyoaktiflik Osteokondüktivite Toksik ve inflamatuar olmama Yüksek aşınma direnci	Düşük dayanım Yüksek kırılganlık Kontrolsüz biyobozunma Sertlik	Kalça eklem ve kemik implantları Kemik dolgusu Yük taşıma uygulamaları Kaplamalar Alveolar büyütme Maksillofasiyal rekonstrüksiyon
DOĞAL POLİMERLER			
Kolajen **Jelatin** **Kitosan** **Hiyalüronik Asit** **Aljinat** **Agaroz**	Biyobozunabilirlik Osteokondüktivite Hücre aktivitelerini destekleme Adezyon sağlama Viskoelastisite Jelleşebilirlik Kimyasal modifikasyona uygunluk	Hızlı biyobozunma veya biyobozunur olmama Suda çözünürlük Sterilizasyon sırasında degradasyon	Kemik ve Diş dolguları İlaç salım sistemleri Yara örtüleri

Tablo 3.1 Doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli biyomalzemelerin avantaj ve dezavantajları [96], [97], [98] (devamı)

SENTETİK POLİMERLER			
Poli(α-hidroksi asit) **Poliüretan** **Poli (ε-kaprolakton)**	Toksik olmama Biyobozunurluk Biyouyumluluk Bozunma ürünlerinin vücut ile uyumlu olması	Hidrofobik yüzey Erozyona uğrama Zayıf mekanik özellikler	Doku iskelesi Vida, pim ve plakalar

3.1.1.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Canlı Hücreler ve İndüktif Ajanlar

Yaygın olarak kullanılan doku mühendisliği stratejisi hücre farklılaşmasını, doku onarımını ve restorasyonu kolaylaştırmak için çeşitli biyomalzemeler kullanarak gözenekli iskeleler geliştirmektir. Daha ileri yaklaşımlar ise canlı ve fonksiyonel yapay kemik doku geliştirmek amacıyla biyomalzemeleri, canlı hücreleri ve indüktif ajanları (biyokimyasal sinyaller) birarada kullanmaktadır [99]. Hücre kaynağı olarak kendini yenileme, üretme ve farklılaştırma yeteneklerine sahip olan embriyonik, uyarılmış pluripotent ve yetişkin mezenkimal kök hücreler kullanılmaktadır. Uygulamalarda genellikle kemik iliğinden elde edilen mezenkimal stromal hücreleri tercih edilmektedir. Alternatif olarak; kas, yağ dokusu, ağız boşluğu, göbek kordonu veya deri kaynaklı mezenkimal kök hücreleri de kullanılmaktadır [100]. Bu hücreler, yeni kemik matrisini salgılamak için fonksiyonel olarak aktif osteoblastlara dönüşerek kemik rejenerasyonunda önemli rol oynamaktadırlar.

Biyokimyasal sinyal iletiminin temel amacı ise iyileşme sürecine destek olmak, hızlandırmak ve aşırı kemik oluşumunu sınırlandırmaktır. Projenitör ve enflamatuar hücrelerin gerekli bölgelere göç ederek gelişim sürecini başlatması büyüme faktörleri ve hücre sinyallerinin kontrolündedir. Kemik iyileşmesinde kullanılan indüktif ajanlar; enflamatuar büyüme faktörleri, sitokinler,

pro-osteojenik büyüme faktörleri ve anjiyojenik büyüme faktörleri olarak sınıflandırılabilir. Bunlardan başlıcaları fibroblast büyüme faktörleri, kemik morfojenik proteinleri (BMP-2 ve BMP-7), vasküler endotelyal büyüme faktörleri, paratiroid hormonu (PTH) ve PTH salıcı peptitler, insülin benzeri ve transformatör büyüme faktörleridir [101]. Sinyal molekülleri ve büyüme faktörleri arasındaki etkileşim karmaşık ve çok değişkenlidir. Biyokimyasal sinyallerin hücrelere iletilmesi için büyüme faktörlerinin salımı ve biyoaktiviteleri oldukça kritiktir. Mevcut farklılaşma ve büyüme faktörleri arasında kemik morfojenik proteinleri ön plana çıkmaktadır. Bu ajanlar, eşsiz yetenekleri sayesinde mezenkimal öncül hücrelerin kondrositlere ve osteoblastlara farklılaşmasını uyararak ektopik ve ortotopik bölgelerde yeni kemik indüklenmesini destekler [102]. Biyomalzemeler, hücreler ve büyüme faktörlerine ait özellikler Tablo 3.2'de verilmektedir [103].

Tablo 3.2 Biyomalzemeler, hücreler ve büyüme faktörlerine ait özellikler [103]

Materyal Türü	**Osteokondüksiyon**	**Osteoindüksiyon**	**Osteojenik Özellik**
Mikroboyutlu Biyomalzemeler	+	-	-
Nanoboyutlu Biyomalzemeler	+	Kazandırılabilir	-
Hücreler	-	-	+
Büyüme Faktörleri	-	+	-

Gelişmiş doku mühendisliği çalışmaları; bu üç temel unsurun etkileşimlerinden faydalanan bir yaklaşımla osteokondüksiyon, osteoindüksiyon ve osteointegrasyon özelliklerini iyileştirmektedir. Bu doğrultuda uygulanan işlem basamakları aşağıda özetlenmektedir [104]:

1. Laboratuvar ortamında bir kaynaktan izole edilen hücrelerin, farklılaşmalarını sağlayacak büyüme faktörlerinin de ilavesiyle, in vitro ortamda çoğaltılarak taşıyıcı iskele üzerine ekilmesi.

2. Hasarlı bölgenin yapısal, mekanik ve biyolojik özelliklerine uygun olarak geliştirilen doku iskelesinin cerrahi müdahale ile defekt bölgeye yerleştirilmesi.
3. İmplantasyon işlemi sonrası gözenekli yapı içerisinde başlayan kemik gelişimi.
4. Hücrelerin kendi hücre dışı matrislerini oluşturmasıyla biyobozunur malzemenin rezorbe edilmesi.
5. Yeni oluşan doğal kemik dokunun uygulanan implantın yerine geçmesi.

3.1.1.3 Kemik Doku İskelesi Üretim Yöntemleri ve Önemli Parametreler

Doku iskelesi terimi, doğal yapıyı simüle ederek hücrelere rejeneratif sinyaller veren ve hasarlı dokuları yeniden yapılandırabilmeleri için uygun ortam sağlayan üç boyutlu (3D) biyomalzemeler için kullanılmaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımıyla bilim insanları doğal ortama benzer, çok işlevli, uygun maliyete sahip ve klinik kullanıma elverişli iskeleler geliştirmeye çalışmaktadır [105]. Doku iskelesi üretiminde dikkat edilmesi gereken en önemli hususlardan biri iskelenin yapısıdır. İdeal bir kemik doku iskelesi birbiri ile bağlantılı farklı boyut ve dağılımlara sahip yüksek gözenekliliğe, sterilizasyon kolaylığına ve yeterli mekanik özelliklere sahip olmalıdır [96]. Ayrıca; degradasyon süresinin de doku yenilenmesini gerçekleştirecek kadar uzun olması gerekmektedir [106].

Tüm bu parametreler ışığında günümüzde kemik doku iskelesi üretimi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler **geleneksel ve ileri üretim** (eklemeli imalat) teknikleri olarak sınıflandırılmaktadır. Günümüzde kullanılan çeşitli yöntemlerden başlıcaları; sinterleme, replika tekniği, sol-jel, çözücü döküm ve partikül liçi, gaz köpürtme, emülsiyon dondurarak kurutma, elektrospin, ısıl indükleme ile faz ayrıştırma, katmanlı imalat ve hızlı prototiplemedir [107].

Çözücü döküm ve partikül liçi tekniği; ulaşılabilirlik, ucuz olması, gözenek boyut ve dağılımının kontrol edilebilirliği (porojen boyutlarına ve porojen/biyomalzeme oranına bağlı olarak) ve uygulama kolaylığı sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [108]. Ayrıca, herhangi bir özel ekipman gerektirmemektedir. Bu

yöntemin temel avantajı, kemik doku rejenerasyonunu destekleyici yüksek por oranına sahip iskeleler oluşturulabilmesidir. Por yapıcı olarak genellikle sodyum klorür veya sodyum sitrat gibi tuzlar kullanılmaktadır. Bunlara alternatif olarak polimerik ajanlar (örneğin; jelatin), balmumu (örneğin; balmumu hidrokarbonlar) veya şeker de kullanılabilmektedir [109]. Bu teknik temel olarak; kullanılacak biyomalzemenin uygun çözücüde çözündürülmesi ve suda çözünür porojen ile karıştırılması prosesine dayanmaktadır. Kullanılan çözücünün buharlaştırılması veya liyofilizasyon sonrası, porojen malzeme su içerisinde çözündürülmektedir. Bu yöntemle üretilen doku iskelelerin gözenekliliği, kullanılan porojenin miktarına ve kristal boyutuna göre belirlenmektedir [110]. Buna bağlı olarak, iskelelenin sahip olduğu mekanik özellikler de değişmektedir. Avantajlarının yanında, doku iskelelerinin yapısında kalabilen çözücülerin toksik etkisi ve karmaşık şekilli iskele üretimine uygun olmama gibi dezavantajları da bulunmaktadır [111] .

İmalat teknikleri genellikle organik çözücüler ve yüksek sıcaklıkların kullanıldığı proseslere dayanmaktadır. Üretimin tamamlanmasının ardından iskele bünyesinde kalabilen çözücü artıkları, klinik uygulamalar sonrası hücrelere ve çevre dokulara zarar verebilmektedir. Bu aynı zamanda doku iskelelerine ilave edilen biyolojik olarak aktif moleküllerin denatürasyonuna da sebep olabilmektedir [112]. Buna karşın, **gaz köpürtme yöntemi** organik çözücülere ve yüksek sıcaklıklara gereksinim duymamaktadır. Bunun yerine, kullanılan gazların (karbondioksit, azot gibi) genleşmesi sonucu gözeneklilik oluşmaktadır. Bu yöntem ile işlem kolaylığına ve uygun maliyete sahip, sünger benzeri doku iskeleleri üretilebilmektedir [113]. Karbondioksit gazı (CO_2) düşük toksisite ve yanıcı olmaması sebepleriyle por yapıcı olarak sıkça tercih edilmektedir. Bu yöntemde, yüksek poroziteye sahip iskelelerin üretimi amacıyla, kullanılan biyomalzemeler yüksek basınçlı CO_2 gazı ile doyurulmaktadır. Gözenek morfolojisi ve boyutları; biyomalzeme içerisinde çözünen gaz miktarı, sıcaklık, basınç, doygunluk derecesi gibi imalat parametrelerine bağlıdır [114]. Bu yöntemin sahip olduğu dezavantajlar; yüzey gözenekliliğinin, por bağlantılarının yetersiz ve kapalı olabilmesidir. Bu sorunun üstesinden gelmek amacıyla, por boyut ve dağılımları gaz köpürtme ve partikül liçi

yöntemlerinin iş birlikleri ile kontrol edilebilmektedir. Böylece farklı porojenlerin de (şeker, tuz, balmumu gibi) ilavesiyle açık por yapısı oluşturulabilmektedir [107].

Isıl indükleme ile faz ayrıştırma yöntemi kolayca kontrol edilebilen, yüksek gözenekliliğe, üç boyutlu ve anizotropik yapıya sahip doku iskeleleri üretmek için kullanılmaktadır [115]. Böylece; sinir, kas, tendon, ligament, bağırsak, kemik ve dişler gibi dokuların hasarlarında kullanıma uygun makro, mikro ve nano ölçekli yapı iskeleleri elde edilmektedir. Yüksek mekanik dayanıma sahip olmasının yanında, organik çözücülerin kullanılması sonucu uzayan işlem (süblimleşme) süresi bu yöntemin dezavantajlarındandır. Bu proses genel olarak, polimerin bir çözücü (örneğin; fenol veya naftalin) içinde çözündürülmesi ve elde edilen homojen çözeltinin soğutulması sonucu faz ayrışması meydana gelmesine dayanmaktadır. Yüksek bir sıcaklıkta gerçekleşen çözündürme işleminin ardından çözelti sıcaklığı düşürülerek sıvı-sıvı veya katı-sıvı fazların birbirlerinden ayrışması sağlanmaktadır [116]. Çözücünün ortamdan uzaklaşmasının ardından gözenekli polimerik doku iskeleleri elde edilmektedir. Ayrıca düşük sıcaklıkların kullanılması, biyoaktif moleküllerin ilavesine de olanak sağlamaktadır. Üretilen doku iskelelerinin özellikleri; kullanılan polimer konsantrasyonuna, çözücü türüne ve sıcaklığa bağlıdır [117].

Sinterleme yöntemi; üç boyutlu ve yüksek gözenekli doku iskeleleri oluşturmak amacıyla yüzey difüzyonu veya emülsiyon/çözücü buharlaştırma tekniği ile üretilen seramik ve polimer esaslı biyomalzemelerin belirli bir sıcaklıkta sinterlenmesi sürecidir. Biyoseramik esaslı başlangıç maddelerine uygulanan öğütme ve eleme işlemleri sonrası istenilen iskele modelinin oluşturulmasıyla belirlenen bir sıcaklıkta sinterleme işlemi gerçekleştirilir [118]. Polimer esaslı iskelelerde sıcaklığın camsı geçiş sıcaklığının üzerinde bir noktaya çıkartılması ile polimer zincirlerinin göç ederek iç içe geçmesi sonucu, birbirleriyle bağlantılara sahip gözenekli iskeleler oluşturulmaktadır. Bu yöntemle, kontrol edilebilir gözenek çapları, ara bağlantılar ve minimum %40 porozite sağlanabilmektedir [112]. Böylece, gözeneklilik oranının ve boyutlarının kontrol edilebilmesine karşın yetersiz por bağlantılarına ve kapalı porlara sahip gaz köpürtme yöntemiyle üretilen

doku iskelelerinin dezavantajları giderilebilmektedir [119]. Geliştirilen sinterlenmiş iskeleler, süngerimsi kemiğe benzer ve klinik kullanıma uygun mekanik özelliklere sahiptir. Daha geniş porlar damarlanmaya olanak sağlarken, daha küçük porlar ise yüzey pürüzlülüğünü arttırarak hücre tutunmasını ve çoğalmasını kolaylaştırlamaktadır [120]. Ayrıca sinterleme ile üretilen doku iskeleri, hücre farklılaşmasını destekleyici büyüme faktörlerinin ilavesine de olanak sağlamaktadır. Bu yöntemde homojen bir yapı elde etmek için belirleyici faktörler; başlangıç maddeleri, ısıtma hızı, sinterleme sıcaklığı ve süresidir. Örneğin; artan sinter sıcaklığı ile birlikte porozite oranı azalmasına karşın porların sahip oldukları hacim ve bağlantılar artmaktadır. Günümüzde uygulanabilirlik, maliyet, sürdürülebilirlik, kontrol edilebilirlik, yeterli gözeneklilik ve mekanik dayanım gibi avantajları sebebiyle sinterleme yöntemi sıkça tercih edilmektedir [121].

Replika yöntemi; özellikle biyoseramik esaslı doku iskelelerinin üretiminde kullanılmaktadır. Bu yöntemde; su veya etanol gibi sıvı bir çözücü içerisinde çözündürülen seramik taneciklerine, por yapıcı ve/veya dispersant ilavesi ile hazırlanan seramik çamur önceden belirlenmiş olan doku iskelesi şablonuna emdirilmekte ve belirli sıcak koşullarında kurutma ve/veya sinterleme işlemlerine tabi tutulmaktadır. Polimerik sünger tekniği, osteokondüktif özellikli greftlerin üretimi için geliştirilen ilk tekniklerden olup; kolay uygulanabilir ve kontrol edilebilir bir yöntemdir [122]. Günümüzde de seramik çamurun homojen dağılımına olanak sağlaması, uygun gözenek boyutu (mikro/meso/makro), benzer por şekilleri (yuvarlak), yüksek gözeneklilik (≥ %70), ara bağlantılar ve kompleks geometrilere sahip olabilme gibi avantajları sebebiyle en sık kullanılan replikasyon tekniklerinden biridir [123]. Bu yöntem ile üretilen iskelelerin bir dezavantajı özellikle de yük taşıyıcı uygulamalar için mekanik özelliklerinin yetersiz kalabilmesidir. Bu durum, seramik çamur formülasyonunun geliştirilmesi ve uygun sinterleme parametrelerinin kullanılması ile iyileştirilebilmektedir [124].

Sol-jel tekniği; düşük maliyeti, uygulama kolaylığı, homojen moleküler bileşim ve düşük işlem sıcaklığı gibi avantajları sebebiyle ön plana çıkmaktadır. İşlem basamakları sırasıyla; sol hazırlanması, yoğunlaşma ve jelleşme aşamalarından

oluşmaktadır [114]. Sahip olduğu homojen bileşime ek olarak, kontrol edilebilir kalsiyum/fosfat (Ca/P) mol oranı nedeniyle doku iskelesi üretimi için ideal bir yöntemdir. Ancak, bu yöntem ile üretilen doku iskelelerinin zayıf mekanik özellikleri iyileştirilmelidir. Örneğin; sol-jel ile üretilmiş cam köpüklerin mekanik mukavemeti sinterleme sıcaklığının arttırılması ile geliştirilebilmektedir [125]. Bu yöntem ile ultra ince veya küresel şekilli, nanokristal tozlar, ince film kaplamalar, seramik elyaflar, mikro gözenekli inorganik membranlar, amorf monolitik katılar ve yüksek gözenekli aerojel malzemeler şeklinde seramik veya cam esaslı iskeleler geliştirilebilmektedir [126].

Elektroeğirme yöntemi (elektrospining); mikron altından nanometer ölçeğine kadar üretime olanak tanıyarak, geleneksel iki boyutlu nanofiberlerin yanı sıra, kemik doku mühendisliği uygulamaları için kullanıma uygun üç boyutlu nanofibröz yapılar da geliştirebilmektedir [127]. Elektrospining prensibi; polimer solüsyonun yüzey geriliminin üstesinden gelmek amacıyla elektrik alan kullanarak, sabit bir sıvı jetin bir iğneden iletken bir toplayıcıya aktarılmasına dayanmaktadır. Viskozite, yüzey gerilimi, elektrik iletkenliği, moleküler ağırlık gibi polimer çözelti koşulları üretim sürecinde etkili parametrelerdir. Bu koşulların ayarlanması ile geliştirilecek morfolojinin kontrol edilebilirliği sağlanmaktadır [128]. Özetle bu yöntem; elektriksel yükler, bir şırınga pompası ve iletken toplayıcı yardımıyla nanometre mertebesine kadar ince lifler üretmek ve böylece, proteinlerin ve hücre reseptörlerinin kolaylıkla bağlanabildiği farklı boyutlarda yapılar elde etmek amacıyla kullanılmaktadır [129]. Son yıllarda; ekstra hücresel matrisi yapısal olarak taklit edebilen nano yapıların üretimine olanak sağlayan, basit kurulum ve maliyet bakımından uygunluğa sahip elektrospining yöntemi oldukça ilgi görmeye başlamıştır. Polimerik iskelelerin geliştirilmesinin yanında seramik ve polimerik malzemelerden oluşan kompozit yapıların üretilmesini de mümkün kılmaktadır [130]. Bunlara ek olarak, yüksek yüzey alanı, ayarlanabilir gözenek boyut ve bağlantıları, yüzey işlevselleştirilebilirliği ve kontrol edilebilir yüzey morfolojisi gibi önemli avantajları da bulunmaktadır [131].

Kemik doku iskelesi üretimi için kullanılan diğer bir teknik ise **dondurarak kurutma** yöntemidir. Doku mühendisliğinin yanı sıra çözeltileri katı maddelere dönüştürmek amacıyla, farmasötikal, enzim stabilizasyonu ve gıda bilimi uygulamalarında da kullanılmaktadır [132]. Düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen bu kurutma işlemi aynı zamanda "Liyofilizasyon" olarak da bilinmektedir [133]. İşlemin düşük sıcaklıklarda gerçekleşmesi biyolojik ortama ait hassas faktörlerin aktivitesinin korunmasına da olanak sağlamaktadır. Proses basamakları; kullanılacak biyomalzemenin uygun bir çözücü içinde çözündürülmesi veya süspansiyon oluşturulması ve dondurulma işlemlerini içermektedir. Katılaşma sonrası kullanılan çözücü, süblimasyon ile yapıdan uzaklaştırılmaktadır [134], [135]. Çözücü olarak kullanılan kimyasallar sınırlıdır. Genellikle, harici bir soğutma işlemi gerektirmeden süblimleşebilen su, tert-bütanol, dimetil sülfon veya asetik asit kullanılmaktadır. Ayrıca; uzun işlem süresi, yüksek enerji tüketimi, çözücülerin toksik etkileri ve düzensiz gözenek dağılımı gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Yaşanan kısıtlamaları gidermek amacıyla donma sıcaklığının optimizasyonu çalışmalarıyla birlikte kristal büyümesini hızlandırmak için tavlama işlemleri de uygulanmaktadır [136]. Ayrıca, dondurarak kurutma yöntemi partikül liç yöntemi ile bir arada kullanılabilmektedir. Bu amaçla hazırlanan çözeltiye sodyum klorür (NaCl) tuzu gibi por yapıcı malzemeler eklenmektedir. Dondurarak kurutma işlemi sonrası, parçacıklar yıkanarak yapıdan uzaklaştırılmaktadır. Böylece birbirine bağlı ve kontrol edilebilir gözenekliliğe sahip iskeleler üretilebilmektedir [137].

Doku ile uyumlu biyomalzemelerin geliştirilmesinde doku iskelesinin sahip olduğu por boyut ve dağılımı da oldukça önemlidir. Porlar arası bağlantılar; hücre göçü, büyümesi, farklılaşması, çoğalması ve ayrıca oluşan atıklar ve iskelelerin bozunma ürünlerinin difüzyonu gibi önemli işlevlere sahiptir. Gözenekliliğin yetersiz kaldığı durumlarda ise hücre göçü zorlaşmakta ve böylece iskelenin osteokondüktif ve osteoindüktif potansiyeli de kısıtlanmaktadır. Bu nedenle geliştirilecek malzemenin, biyolojik aktiviteleri destekleyecek boyut, dağılım ve bağlantılara sahip porlar bulundurması gerekmektedir. Örneğin; 300 mikrometreden (μm) daha büyük porlar vaskülarizasyon (damarlanma), besin taşınımı ve hücre göçüne olanak

sağlarken, sahip oldukları ara bağlantılar ise 100 μm'den daha büyük olmalıdır [138]. Yapılan çalışmalar, 100-300 μm por boyutuna (çap) sahip iskelelerin hücre göçünü hızlandırdığını göstermektedir. Bununla birlikte 100-300 μm por çapları ile karşılaştırıldığında, azalan hücre göçüne rağmen 40 μm'lik por çapına kadar hücresel penetrasyon değerlerlerinin benzer olduğu görülmektedir [139]. Primer sıçan osteoblastları üzerinde yapılan bir çalışma bu durumu desteklemektedir. Farklı gözenek boyutlarına sahip iskeleler kullanıldığında büyük gözeneklere sahip iskelelerin hüre göçünü hızlandırdığı ancak küçük gözenekli iskelelerde ise hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmektedir [140].

Özetle; mikroyapısal özellikler osteogenezi sağlamakta önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte bu porlar hem hücrelerin yer değiştirmesine izin verecek kadar büyük hem de hücrelerin iskeleye bağlanmasını sağlayacak kadar küçük olmalıdır. Yeterli mekanik dayanıma ek olarak sürekliliğe ve kesintisiz por bağlantılarına sahip doku iskeleleri geliştirmek amacıyla; sinterleme, gaz köpürtme ve partikül liçi gibi geleneksel tekniklerle üretilen mikro ölçekli doku iskelelerinde gözenek çapı 40 μm'nin üzerinde olan yapılar elde edilebilmektedir.

Bununla birlikte, indükleme ile faz ayırma ve kendi kendine montaj yöntemleriyle geliştirilen ve %95'ten daha fazla gözeneklilik değerlerine sahip olan nanofiber iskelelerde ise 300 nanometre (nm) ile 10 μm arasında değişen por çaplarına rağmen hücre göçünün gerçekleştiği görülmektedir. Ayrıca, birkaç mikrondan 30 μm'ye kadar değişebilen gözenek çaplarına sahip elektrospin nanofiberlerin de hücresel infiltrasyon sergilediği gözlenmektedir [103]. Bu durum hücrelerin nanofiber yapılar ile karşılaştığında psödopodiye (yalancı ayak) benzer davranış sergilemesi ile açıklanabilmektedir. Böylece çeşitli faktörler ve proteinler kontrolünde gerçekleşen ameboidal (yalancı ayak çıkıntılarıyla gerçekleştirilen amipsi hareket) migrasyon ile hücre infiltrasyonu sağlanmaktadır [141].

Geleneksel yöntemler, **eklemeli imalat teknikleri** ile karşılaştırıldığında özellikle de gözenekli doku iskelelerin geliştirilmesi için gerekli olan kontrollü homojenlik, yüzey geometrisi ve por boyut dağılımını sağlamakta yetersiz kalabilmektedir. Ayrıca geleneksel yöntemler kullanılarak farklı geometrilere sahip olan vakaya özgü

iskelelerin geliştirilebilmesi mümkün olmamakla beraber, bu yöntemler kompleks yapıların oluşturulmasında da etkin olmayabilmektedir [107]. Kemik doku mühendisliği uygulamalarının temel amacı; uygun biyomalzemelerden ve bileşenlerden oluşturulmuş yapı iskelelerini kullanarak, hücreler ve mekanik/kimyasal sinyallerin kombinasyonları yoluyla hasarlı dokuyu iyileştirmek veya yerini almasını sağlamaktır. Bu nedenle günümüzde tüm bu geleneksel üretimin kısıtlamalarının üstesinden gelebilmek amacıyla, klasik uygulamalara alternatif olabilecek farklı yöntemlerle üretilebilen ve malzeme çeşitliliğine sahip poröz, biyoaktif ve 3 boyutlu (3D) doku iskelelerinin geliştirilmesine odaklanılmıştır. Bu sebeple, daha karmaşık şekillere sahip 3D geliştirilmesinde ileri teknolojiler ve teknikler ön plana çıkmaktadır. İlk olarak 1986 yılında Charles Hull tarafından hızlı prototipleme amacı ile geliştirilen 3D basım tekniği daha sonra hastanın defekt dokusundan veri alınarak tasarlanan doku iskelelerinin üretiminde eriyik yığın modelleme (FDM), bağlayıcı püskürtme (BJ), robocasting, seçici lazer sinterleme (SLS) gibi farklı katmanlı imalat yöntemlerinin kullanımı ile gelişim sergilemektedir [142], [143], [144]. Ayrıca, bu yöntemlerle üretilen iskelelerin katman kalınlıkları, filamentler arası mesafe, dolgu deseni gibi yapının iç organizasyonunu etkileyen parametreler kolaylıkla kontrol edilebilmektedir [145]. Böylece hassas olarak tasarlanmış gözenek şekil ve boyut dağılımına sahip, mekanik özellikler bakımından yeterli ve doğal dokuyu taklit edebilen iskeleler geliştirilmesi mümkün olmaktadır.

3.2 Kemik Greftleme Yöntemi ve Geçmişten Günümüze Klinik Önemi

Geçmişten günümüze kemik kayıpları ve kusurları gibi klinik vakalarda hasarlı dokuyu onarmak, değiştirmek veya rejenerasyonunu desteklemek oldukça önemli bir konu olarak görülmektedir. Daha da geçmiş zamanlar değerlendirildiğinde bu konunun çeşitli inançlarda ve mitolojilerde de yeri olduğu bilinmektedir. Yunan mitolojisine ait Zeus efsanesi incelendiğinde örneğin eklemler veya omuz kemikleri gibi çeşitli vücut parçalarının fildişinden yapılmış malzemeler ile değiştirilmesi, güçlendirilmesi ve implantasyon işlemine değinildiği görülmektedir. Efsanelerde

sıkça karşılaşılan bu durum o dönemlerde de, fil dişi gibi vücut organizmalarıyla uyumlu osteoplastik malzemelerden elde edilen çubuklar, çiviler veya ateller aracılığıyla doku iyileşmesinin destekleneceğinin düşünülmekte olduğunu göstermektedir. Çeşitli etnolojik ve arkeolojik kaynaklar incelendiğinde de tarih öncesi zamanlara ait, kemik rejenerasyonunu destekleyici cerrahi bulgulara rastlanmaktadır [146]. Bu uygulamalara örnek olarak; Neolitik çağa ait insan kemiklerinde rastlanan altın plakalar, eski Mısır'lara ait yazıtlarda simgelenen ve mumya kemiklerinde karşılaşılan dental ve ortopedik operasyonlar ve Aztek'lerin kemik kırıkları için geliştirdikleri tedavi yöntemleri verilebilmektedir [147]. Kemik doku kendini tamamen yenileyebilme kabiliyetine sahiptir. Ancak bunun gerçekleştirilebilmesi için bu süreçte rol alan biyolojik materyallere iskele görevi görecek bir sisteme ihtiyaç duymaktadır. Bununla birlikte, yeniden yapılandırma (remodeling) mekanizmasının bozulması ile sonuçlanabilen çeşitli kemik deformasyonlarında doku kendi kendine yenilenme yeteneğini de kaybedebilmektedir. Bu durumun bir sonucu olarak dokuda farklılaşmalar ve fonksiyon kayıpları meydana gelmektedir. Kemik rejenerasyonunu destekleyerek bozulan mekanizmayı sağlıklı bir döngüye çevirmek amacıyla kullanılan yöntemlerden biri de kemik greftlemedir [148], [149], [104]. Kemik greftleme; karmaşık, düzgün iyileşemeyen ve hasta için önemli sağlık riski oluşturan kemik kırıklarını onarmak, oluşumunu kolaylaştırmak ve yara iyileşmesini desteklemek amacıyla hasarlı bölgenin yerini alarak dolgu ve iskele görevi görmesini sağlayan cerrahi bir işlemdir. Kullanılan doğal veya sentetik orijinli ve biyobozunur özellikli malzemeler, antijen- antikor reaksiyonları oluşturmaksızın yeni kemik oluşumunu indükleyici mineral kaynağını sağlamaktadır [150].

3.3 Kemik Greft Malzemeleri ve Özellikleri

Kemik greftleme işlemi için kullanılacak biyomalzemeler; canlının kendisinden alınabileceği gibi, aynı türün farklı bireylerinden veya farklı türlerden alınabilen doğal orijinli malzemeler ve sentetik esaslı biyomalzemeler olabilmektedir. Kemik greft malzemeleri temel olarak:

1. Otogreftler (Otojen Greft): Kişinin kendisinden elde edilen kemik greft malzemeleri
2. Allogreftler (Allojen Greft): Aynı türün farklı bireylerinden elde edilen kemik greft malzemeleri
3. Ksenogreftler (Ksenojen Greft): Farklı türlerden elde edilen kemik greft malzemeleri
4. Alloplastlar (Sentetik Esaslı Greft Malzemeleri): Doğal kemik dokuyu taklik eden sentetik malzemelerden geliştirilen kemik greft malzemeleri

olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlara ek olarak aynı türe ait, aynı antijenik özelliklere sahip bireylerden (ikizler) elde edilen greft malzemeleri ise izogreftler olarak adlandırılmaktadır. Faktör bazlı kemik greft malzemeleri bu yapılara ek olarak büyüme faktörü- beta, fibroblast büyüme faktörleri ve kemik morfojenik proteinleri gibi doğal faktörleri de içermektedir. Hücre bazlı kemik greftleri ise yeni doku oluşumunu destekleyici mezenkimal kök hücreleri gibi biyolojik materyalleri barındırmaktadır [151].

3.3.1 Doğal Kökenli Kemik Greft Malzemeleri

Otojen kemik grefti uygulamaları, hastanın farklı bir bölgesinden alınan kemiğin yine aynı kişide bulunan hasarlı bölgeye yerleştirilmesi sürecidir. Otogreftler diğer greftleme yöntemleri arasında "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Genellikle greft malzemesi olarak süngerimsi kemik tercih edilmektedir. Otojen süngerimsi kemiğin gözenekli yapısı, kemik büyümesi için gerekli olan kan damarlarının içe büyümesini teşvik ederek, besin taşınımı ve hipoksiden kaynaklanabilecek komplikasyonların azalmasını sağlamaktadır [152]. Bununla birlikte periodontal kemik içi defektlerde rejenerasyonun sağlanması amacıyla küçük çipler halinde defekt bölgeye yerleştirilebilen kortikal kemik de otogreft olarak kullanılabilmektedir [12]. İşlem için genellikle iliak krest, proksimal tibia, fibula, kalvaryum, mandibular simfiz, maksiller tüberozite ve ön mandibular ramus gibi zorunlu olmayan kemikler kullanılmaktadır [153]. Uygulanan materyal kişinin kendisine ait olduğundan oluşabilecek immün sistem tepkileri minimuma inmektedir. Ayrıca, hastalık iletimi riski de bulunmamaktadır. Otogreftler, sahip

oldukları canlı osteoprojenitör ve osteoblast hücreleri sayesinde osteojenik özellik sergilemektedir. Aynı zamanda osteoindüktif ve osteokondüktif özellikler de taşımakta olup, bu sayede kemik iyileşmesini desteklemektedir. Sahip olduğu avantajların yanında ikincil bir cerrahi müdahale gerekliliği, artan kan kaybı, enfeksiyon riski, komplikasyonlar ve sınırlı tedarik gibi dezavantajlar otogreftlerin kullanımını sınırlandırmaktadır [18].

Allogreftler aynı türe ait farklı bireylerden (genellikle kadavradan) elde edilen kemik greft malzemeleri olup, yeni kemik gelişimi için osteokondüktif bir çatı oluşturmaktadır [154]. Toz, blok, kemik çipleri (talaşlar), kafes tipi yapılar olmak üzere çeşitli partikül boyutlarında ve hacimlerde kullanılabilmektedir [155]. Donörlerden süngerimsi veya kortikokanel çipler olarak hasat edilen allogreftler tipik olarak tibianın proksimal ve distal ucundaki metafizeal kusurlar için dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır [156]. Canlı veya kadavradan toplanan kemikler genellikle dondurularak kurutulmaktadır. Kurutma işlemi antijenisiteyi azaltmaktadır. Kurutma işlemi sonucunda organik ve inorganik matrisi destekleyici kalsiyum ve fosfat tuzları tutulmaktadır [157]. Bununla birlikte immün sistem reaksiyonlarını azalmak amacıyla etilen oksit veya γ-radyasyonu kullanılarak sterilizasyon işlemi de gerçekleştirilmektedir. Dondurularak kurutma sırasında osteoblastlar ve osteoprojenitör hücreler kaybedilmesine rağmen osteokondüktif özelliğini sürdürmektedir [158]. Allogreftlerin ilk kullanımları otojen kemik miktarının yetersiz kaldığı durumlar ile sınırlandırılmaktaydı. Ancak zamanla kolay erişilebilirliği sayesinde kullanımında önemli artışlar yaşandığı görülmektedir. Örneğin; 1990'lı yılların ortalarında allogreftler, Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan tüm kemik greft uygulamalarının yaklaşık %35'ini oluşturmaktaydı [159]. Klinik uygulama öncesi gerçekleştirilen işlem basamakları esnasında kemik hücrelerinde meydana gelen kayıplar, hastalık bulaşma ve antijenite risklerini azaltmaktadır [155]. Buna ragmen, depolama öncesi gerçekleştirilen kurutma ve sterilizasyon işlemleri allogreft materyallerin maliyetini arttırmaktadır. Ayrıca, ameliyatlarda %20'lere ulaşabilen enfeksiyon riski dahil olmak üzere immün sistem

yanıtları ve hastalık aktarımı (İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), Hepatit B ve C) gibi çeşitli komplikasyonlara neden olabilmektedir [18].

Ksenogreftler, bir başka deyişle heterolog greft materyalleri, farklı bir türden hasat edilen kemikler olarak tanımlanmaktadır. Çoğunlukla sığır ve domuz kökenli kemikler kullanılmakla birlikte at ve mercan gibi farklı türlere ait kemikler de kullanılabilmektedir. Bu malzemeler genellikle inerttirler ve yavaş emilirler. Özellikle de tür farkından kaynaklanabilecek immün sistem tepkilerini en aza indirmek amacıyla bu kemikler, klinik kullanım öncesi çeşitli işlemlere tabi tutulmaktadır. Örneğin inorganik deproteinize sığır kemikleri, tüm organik bileşenlerini uzaklaştırma amacıyla kimyasal işlem ile muamele edilir. Ayrıca elde edilecek malzemeye bağlı olarak farklı ısıl işlemler de kullanılmaktadır [160]. Buna rağmen günümüzde ksenotransplantasyon uygulamalarında istenmeyen immunolojik tepkiler ve metabolik farklılıklardan kaynaklanan komplikasyonlar olmak üzere çeşitli engeller ve etik kaygılar bulunmaktadır [161].

3.3.2 Sentetik Kökenli Kemik Greft Malzemeleri

Geçmişten günümüze kemik grefti prosedürleri travmatoloji, tümör cerrahisi, omurga cerrahisi, enfeksiyon ve revizyon artroplastisinde giderek daha fazla talep görmektedir. Bu malzemeler arasında gözenekli yapıları, sınırsız tedarik imkânı, kolay sterilizasyon ve depolama gibi önemli avantajları sebebiyle yüzyıllar boyunca kemik kusurlarının tedavisinde çeşitli yapay/sentetik malzemeler kullanılmıştır. Sentetik kemik ikameleri; metaller (tantalyum, titanyum, demir veya magnezyum), polimerler (polilaktitler, poliglikolidler, poliüretanlar veya polikaprolaktonlar), genellikle HAp, TCP veya CS biyoseramikler ve bu minerallerin bir kombinasyonundan oluşabileceği gibi biyoaktif camlar, cam iyonomerler veya alüminyum oksitten de oluşabilmektedir [162, 163].

Bu alandaki önemli gelişmeler özellikle 1890'lı yıllarda H. Dresmann'ın sentetik kemik ikamesi olarak Paris alçısını (alçıtaşı) kullanımı ile başlamıştır. Teknolojik ilerlemeler ve kemik iyileşme biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte sentetik biyomateryaller üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır. 1980'lere gelindiğinde

klinik kullanıma uygun TCP ve HAp başta olmak üzere CaP tuzları gibi biyoseramikler, geliştirilen malzemeler arasında yerini almıştır [164].

Sentetik kemik greft malzemeleri osteointegrasyonu sağlayan ve kemik büyümesini uyarmak amacıyla osteokondüktif bir iskele oluşturan yapılar olmakla birlikte osteoindüktif proteinler barındırmazlar [165]. İdeal sentetik kemik greft malzemeleri; yüksek biyouyumluluk, minimal fibrotik reaksiyon ve yeniden modellenme özelliklerine sahip olmalıdır. Mekanik açıdan değerlendirildiğinde ise hasarlı bölgenin ihtiyaçlarına uygun olarak kortikal veya süngerimsi kemiğin dayanımına benzer özelliklere sahip olmalıdır. Örneğin gerilmelere karşı dayanımı sağlayacak ve döngüsel yüklemeler altında yorulma kırılmalarını önleyecek yeterli tokluğu korumak amacıyla sentetik kemik greftinin kusurlu kemik bölgesi ile benzer elastiklik modülüne sahip olması gerekmektedir [166]. Alloplastikler, sahip oldukları avantajların yanında kırılganlık, değişken emilim oranları ve bazı klinik koşullarda sergiledikleri yetersiz performans gibi dezavantajlara da sahiptir. Günümüzde halen optimum oranlara sahip malzemelerin geliştirilebilmesi için yapılan araştırma ve geliştirme çalışmaları sürdürülmektedir. Bu nedenle son zamanlarda özellikle demineralize kemik matrisi ve kemik morfogenetik proteinleri gibi osteoindüktif materyallere olan ilgi artmıştır [162].

3.3.2.1 Biyoaktif Camlar

Biyoaktif camlar ve cam iyonomerler silisyum esaslı bileşikler ailesinden olup kemik dokuya doğrudan bağlanma yetenekleri ile dikkat çeken doku ikameleri arasındadır. Biyoaktif camlar, diğer bir deyişle biyocamlar, elli yılı aşkın bir süredir klinikte dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. İlk olarak 1969 yılında Florida Üniversitesi'nde Larry Hench ve çalışma arkadaşları tarafından keşfedilen bu malzemeler "fizyolojik ortamda mineralize kemik matrise bağlanabilme kapasitesine sahip reaktif materyaller" olarak tanımlanmıştır [167]. Bununla birlikte bu malzemelerin sahip olduğu biyoaktiflik yeteneği de "malzeme ile doku ara yüzeyi arasında biyolojik reaksiyonlara sebep olarak doku ile materyal arasında bağ oluşturma özelliği" olarak ifade edilmektedir. Farklı biyoaktif maddelerin implant-doku arayüzey reaksiyonları ve bağlanma mekanizmaları birbirlerinden farklıdır. Etkileşimlerin

türü ve bağlanma mekanizması açısından osteopratif biyoaktivite ve osteokondüktif biyoaktivite olmak üzere iki tür biyoaktivite bulunmaktadır [168].

Sert, katı ve gözeneksiz bir yapıya ve Na_2O-CaO-SiO_2-P_2O_5 sistemine sahip biyocamlar, sodyum oksit (Na_2O), kalsiyum oksit (CaO), fosfor pentaoksit (P_2O_5) ve silisyum dioksitten (silikat) (SiO_2) oluşmaktadır. Geliştirilen cam bileşimi temel olarak %45 SiO_2, %24,5 Na_2O, %24,5 CaO ve %6 P_2O_5 şeklindedir [169]. Bu yapıların ana bileşeni silisyum dioksittir. İçeriğindeki Na_2O, CaO ve SiO_2 oranlarının değiştirilmesiyle in vivo koşullarda kontrol edilebilir çözünürlüğe sahip malzemeler üretilebilmektedir [166]. 45S5 biyocamı olarak da bilinen yapıların ortaya çıkışından bu yana yüksek bağlanma afiniteli, kemik onarımını destekleyici, kontrol edilebilir bozunma davranışına sahip ve iyon salımı özelliğinin bir sonucu olarak osteojenik potansiyeli barındıran farklı kompozisyonlarda biyoaktif camlar üzerine çalışılmaktadır [170]. 45S5 gibi geleneksel silikatlara ek olarak üretilen fosfat ve borat esaslı camlar farklı uygulamalar için geliştirilmekte olan biyoaktif camlar arasındadır. Daha kararlı yapılar elde etmek amacıyla potasyum oksit (K_2O), magnezyum oksit (MgO) veya bor oksit (B_2O_3) ilaveleri ile geliştiren bu biyomalzemelerde silikat oranı ağırlıkça %45-52 civarındadır. Son zamanlarda ilaç taşıma sistemlerinde ve büyük ölçüde geleneksel tedavi ile iyileşemeyen diyabetik ülserler gibi kronik yaraların iyileşmesinde elde edilen olumlu sonuçlar sebebiyle borat camlarına olan ilgi artmıştır. Bunun nedeni olarak silika esaslı camlara kıyasla daha hızlı çözünme mekanizmalarının yumuşak doku tepkisini etkilemekte olduğu düşünülmektedir [171].

Biyouyumluluk ve biyoaktivite gibi önemli özelliklere sahip ve daha yeni yöntemlerle sentezlenebilen döküm, toz, kompozit ve gözenekli yapılar gibi çeşitli formlarda biyoaktif camların üretimi üzerine yapılan çalışmalar halen sürdürülmektedir. Yaşanılan nanoteknolojik gelişmeler ile birlikte nano ölçekli senteze yönelik yeni stratejiler de geliştirilmiştir. Bu sayede biyoaktif camların spesifik özelliklerinde iyileştirmeler ve kontrol edilebilirlik sağlanabilmektedir. Geliştirilen biyoaktif camlar biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu malzemelerin ilk uygulamaları orta kulak cerrahisinde küçük

kemik ikamesi olarak kullanılan katı forma sahip materyaller şeklindeyken, son zamanlarda ise özellikle de diş hekimliğinin periodonti, endodonti ve implantoloji gibi çeşitli uzmanlık alanları olmak üzere doku mühendisliğinde ve rejeneratif tıpta uygulanmaktadır [172]. Öte yandan, yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkan kemiğe yapışabilen sentetik yüzey aktif biyoaktif camların keşfinin ardından, aynı özelliğe sahip ve spesifik uygulamalara yönelik bir dizi biyoaktif malzeme de geliştirilmiştir. Biyoaktif cam seramikler, biyoaktif CaP seramikler, biyoaktif kompozitler ve kaplamalar bu materyallere örnek olarak verilebilmektedir [173].

3.3.2.2 Cam İyonomerler

Kemik kusurlarının tedavisinde seramiklerin kullanımı konusunda artan bilgi birikimiyle birlikte kemik ikamelerinde kullanıma elverişli yeni bir malzeme olarak cam iyonomerlere ilişkin çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. İlk olarak 1971 yılında Wilson ve Kent tarafından restoratif bir malzeme olarak tanıtılan cam iyonomerler, bazik bileşenin florür içeren kalsiyum aluminasilikat camı ve asit bileşenin alkenoik asitlerin homopolimeri veya kopolimeri olduğu bir asit-baz reaksiyonu sonucu elde edilmektedir. Bir başka deyişle keşfedilen bu yeni çimento özel iyon sızdıran cam tozları ile poliakrilik asidin sulu çözeltileri arasında hızlı olarak gerçekleşen sertleşme reaksiyonlarına dayanmaktadır [174].

Cam iyonomer çimentoların kullanımı özellikle dental uygulamalardaki alveoler kemik defektlerinin onarımında ve kemik büyütme tekniklerinde umut verici bir perspektif oluşturmuştur. Bu materyallerin yapısından silisyum, kalsiyum, fosfat, florür, alüminyum gibi maddelerin salımının gerçekleşebildiği ve doğal olarak biyolojik yapılarda da bulunabilen bu iyonların onarım sürecini desteklediği bilinmektedir. Örneğin CaP hem kemik hem de dişlerin ana inorganik bileşenlerindendir. Bu nedenle ortama salınan bu bileşiğin küçük konsantrasyonlarının bile biyolojik olarak faydalı olması beklenmektedir [175]. Buna rağmen yetersiz dayanım, düşük aşınma direnci ve yüksek kırılganlık gibi bazı dezavantajları cam iyonomerlerin kullanımını sınırlandırmaktadır [176].

3.3.2.3 Alüminyum Oksit (Al_2O_3)

Yüksek safiyetteki alüminyum oksit (alümina) esaslı biyomalzemeler, vücuda yerleştirildiğinde önemli bir immün sistem tepkisi oluşturmayan, biyouyumlu ve iyileşmeyi destekleyen biyoinert materyallerdir. Alümina bazı biyoaktif özellikli yapıların bir bileşeni olabileceği gibi, kendi başına da kemik greft malzemesi olarak işlev görebilmektedir. Biyoaktif yapılar, biyocam veya HAp gibi biyolojik olarak aktif malzemeler ile yapılan kaplamalar sonucu elde edilebilmektedir. Böylece biyoinert davranışın neden olduğu kemik büyümesinde ve greft-doku integrasyonunda zorluklar gibi istenmeyen durumlar giderilebilmektedir [177].

Alümina seramikleri biyoaktif camlarda olduğu gibi implant ve kemik doku arasında iyon değişimine sebep olmaz ve bu nedenle osteointegrasyon sağlamaz. Bunun yerine, oluşan streslerin bir sonucu olarak implant ve onu çevreleyen dokuyla yakın ilişkiler kurulmasına neden olan mekanik bir bağ oluşturur [178]. Al_2O_3 yüksek sertlik, aşınma direnci, kırılma dayanımı ve rijitliğe sahiptir. Bu özellikleri ile çeşitli implant uygulamalarında, protez eklem astarlarında ve küçük kemik replasmanlarında kullanılmaktadır. Osteokondüktif özelliği nedeniyle kemik greft uygulamaları için araştırılsa da, biyoinert davranışı ve osteointegrasyon yetersizliği ortopedik cerrahi uygulamalarında alüminanın kullanımı sınırlandırmaktadır [179].

3.3.2.4 Kalsiyum Sülfat ($CaSO_4$. ½ H_2O)

Kalsiyum sülfat ($CaSO_4$. ½ H_2O) (CS), bir başka ifade ile "Paris alçısı" olarak da bilinmektedir. İlk olarak 10. yüzyılda kemik kırıklarının tedavisi amacıyla Araplar tarafından kullanıldığı belgelenmiştir. 1852 yılında yapılan bir çalışmada Hollanda ordusu askerlerinde yaşanan kırık tedavilerinde kullanıma elverişli bandajlanabilir (günümüzde de kullanılan form) alçı geliştirmiştir. Dıştan tedavilerde kullanımı daha eskilere dayanmasına rağmen kemik greft ikamesi olarak kalsiyum sülfat kullanımı hakkında yapılan çalışmalar o dönemlerde sayıca daha azdır [180]. Bu alanda yaşanan en büyük gelişme ise 1982 yılında Alman asıllı H. Dreesman'ın uzun kemiklerin tüberküloz osteomyelitini tedavi etmek amacıyla %5 fenol çözeltisi ilave

edilmiş Paris alçısını kullanması ve başarılı bir iyileşme sağlaması ile gerçekleşmiştir. Bu alloplastik malzemelerin temel özellikleri biyouyumluluk, hızlı emilim oranı ve osteogenezi uyarma yetenekleridir [180, 181].

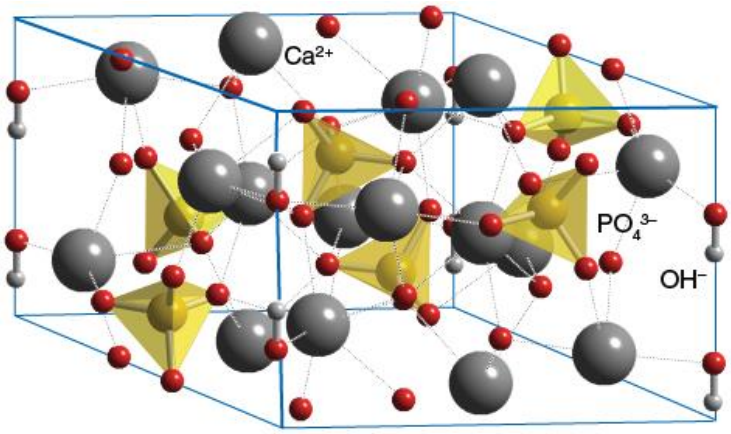
Kalsiyum sülfatın, kan damarlarının ve ilişkili fibrojenik ve osteojenik hücrelerin büyümesi için osteokondüktif bir matris oluşturduğu bilinmektedir. Bu konudaki kritik nokta, kalsiyum sülfat esaslı kemik greftinin çatı görevi görebilmesi için canlı periosteum veya endosteum tabakasına bitişik olması gerekmektedir. Yaklaşık 5 ila 7 haftalık bir süre içerisinde CS, çözünme işlemi ile biyolojik olarak emilebilmektedir. Hızlı emilebilme kabiliyeti özellikle de ilaç salım sistemleri (örneğin antibiyotik ilaveli sistemler) ile entegre edilerek, greft uygulaması sonrası yaşanabilecek komplikasyonları minimuma indirebilmektedir [182]. Böylece ikinci bir cerrahi operasyon gerekliliği riski de azalmaktadır. Özetle, CS kullanımı kemik kusurlarının tedavisinde güvenli, etkili ve kolay erişilebilir bir yoldur. Yapılan çalışmalar sentetik HAp, β-TCP, koralin kemik greftleri ve diğer granüler kemik greftleri ile birlikte kullanılan CS'nin, ileri seviye kemik hasarları dahil olmak üzere kemik iyileşmesini olumlu etkilediğini göstermektedir. Bu gibi bifazik yapıların kullanımı sayesinde, klinisyenlerin karşılaştığı uygulama ve yerleştirme zorluklarını iyileştirilebilmektedir [183].

3.3.2.5 Kalsiyum Fosfat

Günümüzde kemik transplantasyonuna büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Bu uygulamalarda yaygın olarak uygulanan kemik otogreft ve allogreftlerine bir alternatif olarak tek başına veya osteojenik ve osteoindüktif faktörlerle kombinlenebilen CaP esaslı malzemeler kullanılabilmektedir [184]. Memelilerin iskelet dokusunda ve diş yapılarında doğal olarak bulunmaları, biyolojik uyumları, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri sebebiyle CaP biyoseramikler kemik ikamesi ve kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [185]. 1890'lı yıllar itibariyle kemik rejenerasyonunu destekleyici tedavi uygulamaları araştırılsa da klinik başarı elde edilememiştir. CaP esaslı biyoseramiklerin ilk başarılı uygulamaları 1920'li yıllarda Fred H. Albee tarafından hasar görmüş insan kemik dokusunu tedavi etmek amacıyla TCP kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

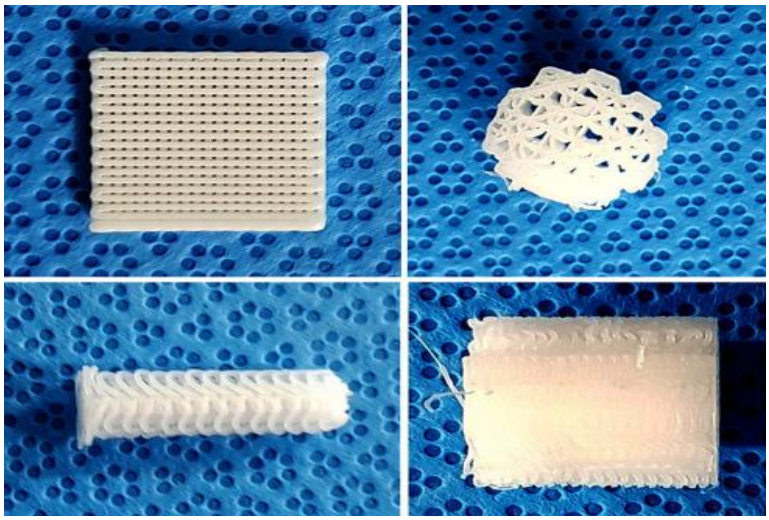
1970'li yıllarda ise bu bileşiklerin, örneğin osteokondüktif özellikli HAp seramiklerin, özellikle de dental uygulamalarda kullanılabilirliği incelenmiştir [186]. İlerleyen yıllarda, sahip oldukları kimyasal, fiziksel ve mekanik özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucu elde edilen yeni CaP biyoseramikler, klinik kullanıma daha uygun hale getirilmiştir. Böylece CaP esaslı malzemeler günümüzde granül, blok, siman, enjekte edilebilir, kaplamalar veya implantlar olmak üzere diş replasmanları, sinüs kaldırma, alveolar büyütme, çok parçalı veya büyük kemik kusurlarının onarımı gibi farklı kemik gelişimi, iyileşmesi ve replasman uygulamalarında kullanılmaktadır [187].

Çeşitli CaP biyoseramikleri arasında özellikle hidroksiapatit (HAp), trikalsiyum fosfat (TCP) ve bunların kompozitleri olan bifazik kalsiyum fosfat (BCP) malzemeler ön plana çıkmaktadır. $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ kimyasal formülüne sahip **hidroksiapatit (HAp),** kemik ve diş gibi sert dokuların önemli bir bileşeni olup, kaynaklarına göre mercan, sığır veya deniz yosunu gibi biyolojik kökenli ve sentetik kökenli HAp'ler olarak sınıflandırılmaktadır. Yapısı gereği genellikle hegzagonal (altıgen) sistemde kristalleşir. Bu sistem altıgen dönme simetrisi ve yansıma düzlemi ile $P6_3/m$ uzay grubuna aittir. HAp birim hücresinin kafes parametreleri a ekseni= 0,9422 nm ve c ekseni= 0,688 nm'dir. HAp yapısı, birim hücrenin iskeletini oluşturan fosfatın (PO_4^{3-}) tetrahedral dizilimi ile oluşur. Birim hücre başına 44 atoma sahip HAp birim hücresi, altıgen formda birlikte düzenlenmiş kalsiyum, fosfat ve hidroksit (Ca^{2+}, PO_4^{3-} ve OH^-) iyon gruplarından oluşur [188]. HAp birim hücresine ait görüntü Şekil 3.2'de verilmiştir [189].



Şekil 3.2 Hidroksiapatit birim hücresi [189]

İnsan ve hayvan kemik mineraline benzerlikleriyle kemik onarımı ve büyümesinde destekleyici rol oynamaları sayesinde, ortopedik ve dental uygulamalarda yaygın olarak tercih edilmektedirler [190]. Doğal veya sentetik HAp biyoseramikleri farklı mikroyapı, kristal boyutları ve gözenekliliğe sahip olmalarına karşın, her iki formda da osteokondüktif potansiyele sahiptir. Buna rağmen, düşük mekanik mukavemetleri bu malzemelerin yük taşıma uygulamalarındaki kullanımını sınırlar. Bu kısıtlandırmayı gidermek amacıyla daha geniş yüzey alanı sayesinde gelişmiş sinterlenebilirlik ve yoğunlaşma özellikleri gösteren nanokristalin HAp'ler geliştirilmiştir. Bununla birlikte, HAp'lerin TCP'ler ile karşılaştırıldığında yavaş biyobozunma davranışı uygulama sonrası yeni kemik oluşumunun yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Kullanımı kısıtlayabilen bu sorunun üstesinden gelebilmek amacıyla stronsiyum-HAp, magnezyum-HAp ve silisyum-HAp gibi iyonlarla katkılandırılmış malzemeler geliştirilerek mekanik ve biyolojik özelliklerin iyileştirilmesi hedeflenmiştir [191]. Elde edilen gelişmelerle birlikte günümüzde çeşitli morfolojilerde üretilebilen HAp parçacıkları; doku iskeleleri, kaplamalar, kemik rejenerasyonu için ilaç taşıyıcı sistemler gibi kemik rejenerasyonu uygulamalarında kullanılabilmektedir [192]. Farklı tasarımlara sahip sentetik HAp esaslı doku iskeleleri Şekil 3.3'de gösterilmiştir [191].

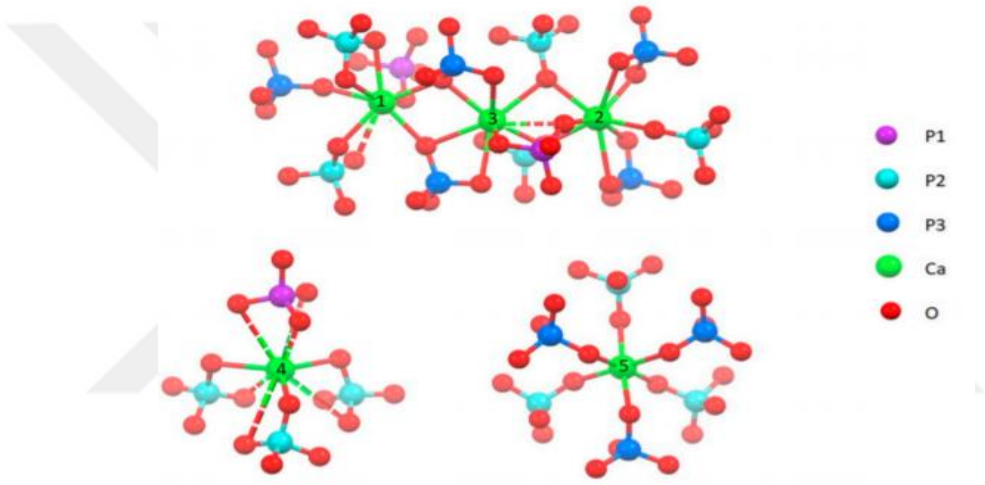


Şekil 3.3 Farklı tasarımlara sahip sentetik hidroksiapatit doku iskeleleri [191]

$Ca_3(PO_4)_2$ kimyasal formülü ile ifade edilen ***trikalsiyum fosfat (TCP)*** ailesi kalsiyum eksik HAp'nin (Calcium Deficient Hydroxyapatite; CDHA) yüksek sıcaklıklarda sinterlenmesi işlemi ile elde edilmektedir. Yaygın olarak kullanılan polimorfları beta trikalsiyum fosfat (β-TCP) ve alfa trikalsiyum fosfat (α-TCP) olup, HAp'ye göre (1,67) daha düşük (1,50) Ca/P mol oranına ve daha yüksek gözenekliliğe sahiptirler [193]. Bu sayede fizyolojik koşullar altında daha hızlı emilebilirler ve dolayısıyla daha hızlı kemik oluşumu sağlarlar [194]. α′-TCP olarak bilinen diğer polimorf ise yalnızca >1430°C sıcaklıkta meydana gelip, geçiş sıcaklığının altına soğutulduğunda α-TCP'ye dönüşmesi sebebiyle pratikte ilgi görmemektedir [195]. β-TCP oda sıcaklığında kararlıdır ve >1200°C'de α-TCP'ye dönüşmektedir. α-TCP, β-TCP ile karşılaştırıldığında birim hücre başına daha fazla hacime sahip olmasından dolayı daha yüksek iç enerjiye sahiptir. Bu durum α-TCP'nin yüksek sıcaklık fazı olması ile ilişkilidir [196]. CaP kemik çimento ve macunların ana hammaddesi olan ve yüksek sıcaklıklarda sinterleme işlemi ile elde edilen monoklinik yapılı α-TCP, β-TCP'ye kıyasla daha reaktif ve biyobozunurdur. Bu nedenle klinik uygulama sonrası kemik oluşumu için yeterli süreyi sağlayamamaktadır.

Rombohedral yapılı **beta trikalsiyum fosfat (β-TCP)**, trigonal sistemde (altıgen işaret) kristalleşmekte olup R3c uzay grubuna aittir. Birim hücre kristalografi parametreleri sırasıyla a= b= 10,439 Å ve c= 37,375 Å (α= β= 90° ve γ= 120°, altıgen

düzen) şeklindedir [197]. HAp ile kıyaslandığında daha az esnek bir kafes yapısına sahip olmasıyla birlikte, özellikle kalsiyum iyonlarının iki değerlikli katyonlarla yer değiştirmesi gibi bazı iyonik değişimler barındırabilir. β-TCP yapısında bulunan kalsiyum iyonları beş farklı katyon bölgesini işgal eder. Ca (1), Ca (2) ve Ca (3) sekiz ila dokuz koordineli oksijen içeren genel konumda bulunmaktadır. Hem Ca (4) hem de Ca (5) ise, diğer katyon bölgelerinin 1/3'ü kadar olmak üzere, özel konumda yer almaktadırlar. β-TCP yapısında bulunan fosfor ise, kristalografik olarak farklı üç pozisyonda görülmektedir. Bulunma oranı bakımından P (1) çokluğu P (2) ve P (3)'ün 1/3'üne gelecek şekilde özel bir pozisyonda bulunmaktadır. β-TCP'nin beş farklı katyon bölgesine ait koordinasyon geometrisi Şekil 3.4'te verilmektedir [198].



Şekil 3.4 β-TCP'nin beş farklı katyon bölgesine ait koordinasyon geometrisi [198]

Yüksek saflıkta ve homojenlikte üretilebilen, biyouyumlu ve osteokondüktif özelliklere sahip β-TCP biyoseramikler, kemik büyümesini ve ayrıca osteoblastların ve mezenşimal hücrelerin bağlanmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemektedir. Böylece kemik yeniden modellenme mekanizmasının ilk adımı olan osteoid oluşumunu uyarırlar [199]. Aynı zamanda, hastalık taşınımı riski bulundurmama ve immünolojik tepkiye sebep olmama (biyo-güvenlik), sterilizasyon kolaylığı, uzun raf ömrü ve neredeyse sınırsız erişilebilirlik özellikleri sayesinde β-TCP esaslı malzemeler, kemik ikame maddesi olarak ön plana çıkmaktadır [200]. Emilim, bozulma ve yeni kemik oluşumu arasındaki dengeyi

sağlayabilmenin yanı sıra rejenerasyon için gerekli inorganik tuzları salgılayarak yapısal stabiliteyi de korumaktadır [201]. Defekt bölgeye yerleştirildiğinde β-TCP kemik greftleri, osteoklastlar tarafından tamamen rezorbe edilmektedir. İmplantasyon sonrası yaklaşık 13-20 hafta arası süren emilme sürecinin ardından β-TCP malzeme yerini yeniden modellenmiş kemik dokuya bırakır. Bu süreçte sahip olduğu birbirine bağlı gözenekler ile osteojenik hücrelerin ve besinlerin kılcallık yoluyla kolonizasyonunu kolaylaştırarak kemiğin yeniden şekillenme sürecini hızlandırmaktadır. Bununla birlikte yapılan araştırmalar bu malzemelerin anjiyogenezi etkileme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir [202].

β-TCP biyoseramiğinin kemik ikamesi olarak kullanıldığı ve otogreftler ile kıyaslandığı bir klinik çalışmada, toplamda 50 hastanın 25'ine otogreft, kalan 25'ine ise β-TCP greft malzemesi uygulanmıştır. Ameliyat sonrası 52 hafta boyunca gerçekleştirilen değerlendirmeler sonucunda, otogreft ile tedaviye kıyasla karşılaştırılabilir füzyon oranları, daha az ağrı ve yan etki oluştuğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile β-TCP'nin tek başına kullanılmasının osteojenik süreci başarıyla destekleyebileceği sonucu ortaya koyulmuştur [203]. Bununla birlikte, β-TCP biyoseramiklerin HAp'lere benzer olarak magnezyum oksit (MgO), çinko oksit (ZnO), stronsiyum oksit (SrO) ve silisyum dioksit (SiO_2) gibi katkı maddeleri ile fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik özellikleri geliştirilebilmektedir [22].

Toz, granül, bulk veya gözenekli biçimlerde ve kristal veya amorf gibi farklı fazlarda olmak üzere, CaP biyoseramikler klinik uygulama sonrası bitişik kemik ve çevresindeki yumuşak doku ile güçlü kimyasal bağlar oluşturarak rejenerasyon ve fiksasyon sürecine önemli katkılar sağlarlar. Bu malzemeler gözeneklilik, bileşim ve kristallik derecesi bakımından farklılıklar göstermektedirler [170]. Kontrol edilebilir biyoaktivite sağlamak amacıyla çeşitli fabrikasyon teknikleri kullanılarak farklı mikro yapılar ve özellikler elde edilebilir [18]. Ayrıca, CaP biyoseramiklerin kalsiyum/fosfat (Ca/P) mol oranları, tane boyutu, gözeneklilik ve hücre davranışları üzerinde etkilidir [204].

CaP esaslı biyomalzemelerin sahip oldukları sertlik ve kırılma dayanımı gibi mekanik özellikler, temel olarak amorf faz oranına bağlı olup, gözeneklilik ve tane

boyutuna göre değişkenlik gösterebilmektedir. Yapısı gereği doğal kemik doku; nanoyapılı HAp kristalleri sayesinde sertlik özelliğine sahipken, kolajen lifler ise dokuya elastiklik kazandırmaktadır. Bu nedenle doğal kemik doku yüksek gerilme mukavemeti ve kırılma tokluğuna sahiptir. CaP biyoseramikler ise yüksek basınç dayanımlarına sahip olmalarına rağmen düşük kırılma tokluğu özellikleri uygulamalarını sınırlandırabilmektedir. Bozunma davranışları ise kristalliklerine, Ca/P mol oranlarına bağlı olup, kristalin CaP'lerin in vivo şartlarda tamamen bozunması uzun zaman gerektirmektedir [205]. Ca/P mol oranı 1'den az olan bileşikler, azalan Ca/P mol oranı ile daha yüksek hidroliz hızına sahip olmaları nedeniyle implantasyon için uygun görülmemektedir. Ca/P mol oranı 1,5 olan β-TCP biyoemilebilir bir materyal olarak sınıflandırılırken, stoikiometrik Ca/P molar oranı 1,67 olan sinterlenmiş HAp ise biyoemilebilirlik göstermeyebilir. Buna karşın, HAp belirli safsızlıklar ve yapısal kusurlar oluşturularak, porojen maddeler eklenerek, tane boyutu nano ölçeğe düşürülerek veya bifazik yapılar oluşturularak emilebilir hale getirilebilmektedir [206]. Bu nedenle istenen kimyasal ve fiziksel özellikleri sağlamak amacıyla HaP ve TCP esaslı malzemelerin kombinasyonu olan BCP'ler kullanılarak, hasarlı bölgenin gerektirdiği dayanıma sahip ve yeni kemik oluşum hızına uygun kontrol edilebilir malzemeler geliştirilmektedir [207].

TCP biyoseramikler arasında özellikle de β-TCP tek kristalleri, geniş çatlak köprüleme özelliği sayesinde HAp tek kristallerine göre daha yüksek kırılma tokluğuna sahiptir. Metsger ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, yoğun TCP seramiklerin 315 MPa basınç dayanımı, 21 GPa Young modülü ve 2,34 $J.cm^{-3}$ kırılma tokluğu değerleri ile ile HAp seramiklerin 70 MPa basınç dayanımı, 9,2 GPa Young modülü ve 0,36 $J.cm^{-3}$ kırılma tokluğu değerlerinden üstün olduğunu bildirmiştir. TCP ve HAp'nin mekanik özelliklerindeki bu farklılıklar nedeniyle BCP seramik içerisindeki oranları, biyomalzemenin mekanik performansını belirlemektedir [208].

CaP esaslı biyomateryaller, reaktiviteleri ve fizyolojik ortamda buna bağlı olarak gerçekleşen çözünme, çökelme ve iyon değişimi sayesinde biyolojik apatite dönüşebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, simüle edilmiş fizyolojik çözeltide yüksek

çözünmeye maruz kalan CaP malzemelerin, yüzeylerinde biyolojik olarak eşdeğer bir apatitin geri çökelmesine neden olduğu görülmektedir [209]. Biyoaktif CaP seramiğin yüzeyine biyolojik proteinlerin adsorpsiyonu doku iyileşmesi ile yakından ilişkilidir. $R\text{-}COO^-$ ve $R\text{-}NH_3^+$ gibi fonksiyonel protein grupları ile kalsiyum fosfat seramiklerin sahip olduğu Ca^{2+} ve PO_4^{3-} bölgeleri arasındaki yüksek afinite protein adsorpsiyonunu arttırmaktadır [210]. Aynı zamanda, CaP biyoseramiklerin gözenekli yapısı filtre görevi görmekte olup, vücut sıvısı içerisindeki büyüme faktörlerini yapısındaki mikro gözeneklerin içerisinde biriktirmektedir [16]. Ek olarak bu malzemeler, kemik oluşumundan sorumlu hücrelerin göçünü, olgunlaşmasını, bağlanmasını ve çoğalmasını destekleyici uyumlu bir biyolojik performans sergilerler [211]. Bu özellikleri sebebiyle kemik kusurlarının tedavisinde ana veya kısmi bileşen olarak kullanılırlar.

Günümüzde ticari CaP esaslı kemik greft malzemeleri farklı üretim ve sinterleme yöntemleri kullanılarak putty (macun), granül veya blok gibi çeşitli formlarda bulunmaktadır [212]. Ancak bu yapıların her defekte uygun olmama, implantasyon işlemi sırasında karşılaşılabilen zorluklar, ek hazırlık süreci gerekliliği ve hijyen sorunları gibi bazı dezavantajlara sahip olmaları klinik kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle yapılan son çalışmalarda, minimal invazif bir ameliyat ile çeşitli kemik kusurlarına kolaylıkla uygulanabilen ve mevcut dezavantajların üstesinden gelebileceği ön görülen enjekte edilebilir form büyük önem kazanmıştır [213].

3.4 Enjekte Edilebilir Kemik Greftleri ve Klinik Üstünlükleri

Kritik boyutlardaki ve karmaşık şekilli kemik kusurlarının tedavisi ortopedi ve travma cerrahisi alanlarında hala en zorlu sorunlar olarak görülmektedir [214]. Bu nedenle minimal invaziv cerrahi prosedürler oldukça popüler hale gelmiştir. Özellikle de bir enjektör yardımıyla kemik doku kusurlarına doğrudan uygulanabilen biyoemilebilir ve osteokondüktif enjekte edilebilir greft materyallerine olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Ciddi şekilde hasar görmüş proksimal veya distal tibial metafiz kırığı olan sekiz hastaya iç fiksasyon işlemi öncesi geçici intraoperatif yapısal destek sağlamak amacıyla enjekte edilebilir kemik

dolgu malzemesi uygulanan bir çalışmada, bu malzemelerin tüm hastalarda yeniden kemik büyümesine yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, uygulama sonrası 8 hastanın 7'sinde, 3 ay içerisinde %90'ın üzerindeki oranlarda kemik oluşumu olduğu gözlenmiştir. Böylece enjekte edilebilir kemik ikamesi kullanımının, örneğin metafiz kırıklarının onarımı gibi ortopedik uygulamalarda minimal invaziv cerrahi ile osteokondüktif ortam oluşturmak için uygun bir alternatif olduğu belirlenmiştir [215].

Enjekte edilebilir kemik ikame malzemelerinin uzun yıllardır piyasada bulunmasına rağmen bu materyallerin potansiyel uygulamalarda ne zaman, nasıl ve hangi koşullarda kullanılabileceği ve yararlı olabileceklerine dair bilgiler hala oldukça sınırlıdır. Mevcut enjekte edilebilir biyomalzemeler CaP esaslı ve CS esaslı olmak üzere iki temel grupta sınıflandırılabilir. Bu yapılar, doku büyümesini sağlamak amacıyla kemik kırık boşluklarına uygulanabildikleri gibi zayıf kemik doku büyütmeleri için implante edilen vidanın etrafına da enjekte edilebilmektedir. Cerrahi müdahale sonrası CaP esaslı ürünler zamanla normal kemiğin yeniden şekillenmesini taklit eden, hücre destekli bir süreçle dokunun yeniden yapılanmasını sağlarken, CS esaslı ürünler ise hücre destekli olmayan daha hızlı bir proses ile biyolojik ortamda çözülmektedir [216]. CS esaslı enjekte edilebilir doku ikamelerinin hızlı rezorpsiyon oranları ve zayıf iç kuvvetleri kullanım alanlarını sınırlandırmaktadır [217]. Enjekte edilebilir CaP esaslı biyomalzemeler sahip olduğu biyoaktiflik özelliği nedeniyle geçmişten günümüze araştırmacılar tarafından yüksek ilgi görmektedir [218]. Elde edilen gelişmelerle beraber, 1996 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan CaP esaslı kemik ikameleri, düzensiz ve karmaşık şekillerdeki kemik kusurlarını doldurmak amacıyla uygun şekilde enjekte edilebilmekte ve yeni kemik oluşumu için gerekli osteokondüktif özelliği karşılayabilmektedir [213].

Enjekte edilebilir greftler çok fazlı yapılar olup, aktif faz ve taşıyıcı sistem içermektedir. Biyoaktif faz genellikle biyoseramikler ve çeşitli ilaçlar gibi osteokondüktif ve osteoindüktif özellikli malzemelerden meydana gelmektedir. İkincil faz ise biyoaktif fazın yapı içerisinde homojen olarak dağılmasını sağlayan ve

genellikle polimerik malzemelerden oluşan taşıyıcı kısımdır [219]. Enjekte edilebilir bir yapı elde etmek amacıyla β-TCP biyoseramik malzemeler, uygun polimerik katkı malzemeleri, hidroksipropilmetil selüloz, karboksimetil selüloz, laktik asit, aljinat, jelatin, gliserol ve kitosan gibi taşıyıcı ajanlar ile birlikte kullanılmaktadır [220]. CaP esaslı biyoseramikler ile biyopolimerlerin bir arada kullanılması ile greftlerin sahip olduğu fizikokimyasal ve mekanik özellikler geliştirilmektedir. Ayrıca, biyopolimerler sayesinde çevre dokunun biyolojik cevabı iyileşmekte ve daha kontrollü biyobozunma davranışı elde edilmektedir [221]. Bununla birlikte, biyoseramik/biyopolimer kombinasyonu sayesinde biyoseramiklerin tek başına kullanımını kısıtlayan yüksek kırılganlık ve ön görülemeyen bozunma hızı sorunlarının üstesinden gelinmektedir [222]. Polimer-seramik kompozitler enjekte edilebilir macun yapıları sayesinde defekt bölgeye yerleştirilerek boşluğun tam doldurulmasına olanak sağlar. Bu şekilde, granül ve blok gibi farklı greft formlarının klinikte görülen dezavantajları giderebilmektedir [223]. Hayvanlar üzerinde yapılan in vivo çalışmalar, β-TCP/polimer kompozit kemik greft malzemelerinin yüksek doku uyumluluğu gösterdiğini ve kemik defektine implante edildikten sonra kemik rejenerasyonunu desteklediğini göstermektedir. Ayrıca, enjekte edilebilir β-TCP esaslı kemik ikameleri poroz yapıları sayesinde madde iletimine ve hücre geçişlerine uygun malzemeler olup kemik rejenerasyonunu desteklemektedir [224]. Yapılan bir çalışma incelendiğinde; ön servikal diskektomi ve füzyon (omur iliğinde fıtıklaşan veya zarar görmüş bir diskin alınması için yapılan ameliyat) gerçekleştirilen hastalara (16 hasta), enjekte edilebilir β-TCP (Suprabone) uygulanması sonucunda, bu malzemelerin kullanımının kemik rejenerasyonu için osteokondüktif potansiyel gösterdiği, uzun dönem stabilite sağladığı ve otojen greftlere göre morbidite riskini azalttığı gözlemlenmiştir [225].

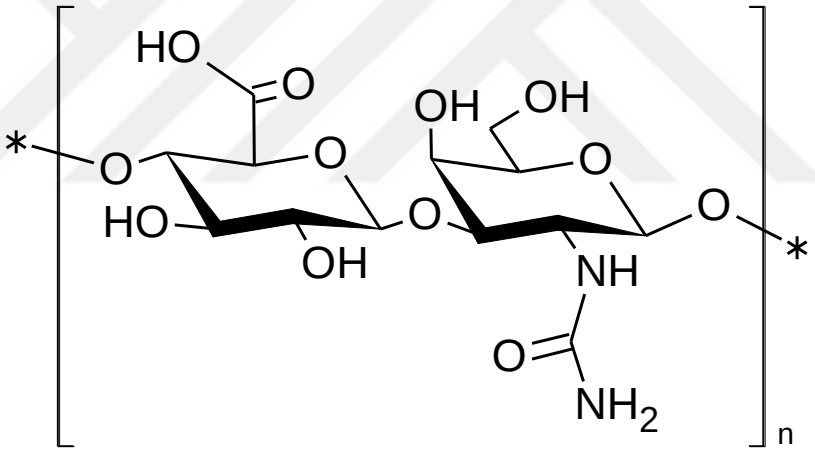
3.4.1 Enjekte Edilebilir Kemik Greft Malzemeleri ve Uygulamaları

Enjekte edilebilir kemik greftlerinin geliştirilmesinde aktif biyoseramik fazın homojen dağılımını destekleyecek aljinat, agaroz, kitosan, kolajen, hiyalüronik asit veya selülozik malzemeler gibi çeşitli taşıyıcı doğal polimerler kullanılmaktadır

[226]. **Aljinat;** hidrojel yapıya, düşük immünojenik özelliğe ve yüksek kaynak miktarlarına sahiptir. Aljinat zincirlerinin farklı pozisyonlarında kalsiyum ve çinko katyonları ile çapraz bağlanabilme kabiliyeti sayesinde en çok çalışılan doğal polimerlerden biridir. Buna karşılık doğal kaynaklardan elde edildiğinden dolayı ağır metaller, endotoksinler, proteinler ve polifenolik bileşikler gibi çeşitli safsızlıkları içerme potansiyeline sahip olması, doku özgüllüğünün bulunmaması ve hücre tutunmasına elverişli olmaması gibi eksikliklere sahiptir [227]. **Agaroz;** ortopedik, oral ve maksillofasiyal cerrahide, özellikle doku mühendisliği alanında kemik hücreleri ve büyüme faktörleri için geçici bir iskele olarak osteoblast büyümesini teşvik etmekte ve organik matris birikimini desteklemektedir. Ancak mineralizasyon kapasitesi ve elastisite modülü düşüktür [228]. Çevrede yaygın olarak bulunmayan ancak deniz kabuklularından ve mantar hücrelerinin duvarlarından deasetilasyon işlemi yoluyla kolayca üretilebilen **kitosan;** yüksek kaynak miktarı, biyouyumluluk ve antibakteriyel özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte yüksek büzülme kapasitesine, hızlı bozulma oranlarına ve düşük mekanik mukavemete sahiptir [229]. İskelet sisteminin doğal yapısında da mevcut olan **kolajen;** mükemmel biyouyumluluk, osteoblast tutunmasını ve farklılaşmasını destekleme, besin transferini kolaylaştıran yarı geçirgenlik, kontrollü biyobozunurluk ve asit bozunma ürünlerine sahip olmama gibi üstün özelliklere sahiptir. Kolajenin en büyük dezavantajı; makrofajların ve polimorfonükleer lökositlerin enzimatik aktivitesine bağlı olarak hızlı biyolojik bozunmasıdır. Ayrıca, yetersiz mekanik özellikler ve buna bağlı olarak zayıf osteokondüktiflik gibi dezavantajları da bulunmaktadır [230].

Doku iyileşmesi ve büyümesi sadece hücre içi gerçekleşen biyolojik bir süreç değildir. Aynı zamanda hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini de içermektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, geliştirilecek doku iskelesinin hem hücrelerin tutunduğu yüzey hem de hücre dışı mikro ortam görevi göreceği düşünülebilmektedir [231]. Bu nedenle tercih edilecek taşıyıcı fazın biyolojik ortamdaki davranışı ve etkilerinin biyoaktif fazın seçimi kadar önemli olduğu söylenebilmektedir.

Farklı formlarda bulunabilen, immünojenik olmayan ve çeşitli biyolojik fonksiyonlarda görev alan **hiyalüronik asit veya hiyalüronan (HA)**; hücre dışı matrisin ana bileşenlerinden olup sülfatlanmamış bir glikozaminoglikandır [232]. Hiyalüronik asit; yapısında kompleks şeker formundaki hiyalüronan türevleri olan hylan polimerleri içeren elastovisköz bir sıvıdır. Bu yapı N-asetil-d-glukozamin ve d-glukuronik asit kalıntılarından meydana gelmekle birlikte, lineer yapılı suda çözünür bir polisakkarit olarak da tanımlanabilir [233]. Diğer glikozaminoglikanlardan farklı olarak, HA, tiyol işlevselliğinden ve belirli çekirdek proteinlerle kovalent bağlardan yoksundur. HA'nın glikozaminoglikan zinciri negatif yüklü olduğundan, katyonları ve suyu çekerek büyük hacimlere şişme özelliği sergilemektedir [234]. Hiyalüronik asite ait kimyasal yapı Şekil 3.5'te gösterilmektedir. %100 biyobozunma özelliğine sahip olan HA, eklem kıkırdaklarındaki hücreler tarafından salgılanmakta olup, tüm bağ dokularında ve eklemlerin sinoviyal sıvısında bulunmaktadır [235].



Şekil 3.5 Hiyalüronik asit kimyasal yapısı

Doğal bir hücre dışı matris bileşeni olan HA, fizikokimyasal özellikler ve hücre biyolojisine etkileri olmak üzere iki temel başlıkta incelenebilmektedir. HA'nın başlıca fizikokimyasal özellikleri; viskozite, elastiklik, yağlama ve yüksek su tutma kapasitesidir. Hücre biyolojisine etkisi incelendiğinde ise HA; HA reseptörleri, CD44 antijeni (hücre yüzeyi glikoproteini) ve RHAMM (hiyalüronan aracılı motilite reseptörleri) kontrolünde gerçekleştirilen hücre hareketliliği, proliferasyonu,

farklılaşması ve hücre-hücre etkileşimleri gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadır. Bunlara ek olarak, çeşitli sitokinler, prostaglandin E2 (PGE2) ve matris metaloproteinazlar gibi hücresel fizyolojik maddelerinin üretiminde de görev almaktadır [236]. Böylece, biyolojik yapıya benzer bir ortam sağlaması nedeniyle, klinik olarak eklem ve kıkırdak hastalıkları için rejeneratif tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kemik iyileşmesinde büyük önem taşıyan mezenşimal hücrelerin göçünü, adezyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemektedir [237]. Bu durum esasen, HA'nın su içeriği sayesinde hücre hareketinden kaynaklanan sıkıştırma kuvvetlerine direnmesi ve böylece hücreler göç ederken doku şeklinin koruması olarak açıklanmaktadır [237]. HA hakkında birçok araştırma yapılsa da özellikle osteogenez üzerine etkisi ve daha spesifik mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bununla birlikte hücre çoğalması ve farklılaşması gibi osteogenetik etkinin, HA'nın molekül ağırlığına ve konsantrasyonuna bağlı olduğu gözlemlenmektedir [238]. Örneğin; yüksek moleküler ağırlıklı formun proinflamatuar mediyatörlerin üretimini inhibe ettiği, kemik rezorpsiyonununda rol alan osteoklast hücrelerinin farklılaşmasını önlediği ve kemik oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir [239].

Enjekte edilebilir sistemlerde, taşıyıcı faz olarak HA kullanıldığında, aktif faz ile kemik doku arasındaki adezyonun arttığı gözlemlenmiştir [240]. β-TCP ile birlikte su, HA veya polietilen glikol kombinasyonu kullanılan bir çalışmada; HA ve polietilen glikolün, tiksotropi, viskozite ve enjekte edilebilirlik üzerindeki etkisi ölçülmüştür. Sonuç olarak, distile suyla hazırlanan numunelerin düşük viskoziteye sahip olması ve enjeksiyon sırasında faz ayrışması sergilemesi nedeniyle uygun olmadığı tespit edilmiştir. Buna karşın HA kullanımının viskoziteyi ve tiksotropiyi arttırarak enjekte edilebilirliğin iyileşmesine yol açtığı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen parametreler geliştirilerek kemik doku mühendisliği uygulamaları için faydalı sonuçlar elde edilebileceği ön görülmektedir [241]. Bununla birlikte, enjekte edilebilirliği arttırmak amacıyla bir veya birden fazla taşıyıcı faz ve destekleyici malzemeler bir arada kullanılarak hedeflenen özellikler elde edilebilmektedir.

Kemik doku mühendisliğinde yaşanan son gelişmeler ile enfeksiyon riskini azaltan, cerrahi yara izi ve yoğun kan kaybını önleyen, enjekte edilebilir yani minimum invazif bir ameliyatla defekt bölgesine yerleştirilebilen osteokondüktif ve osteoindüktif enjekte edilebilir kemik greft malzemelerine olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Mevcutta kullanılan bazı ticari β-TCP ve CaP içeren enjekte edilebilir ürünler Tablo 3.3'te gösterilmektedir.

Tablo 3.3 Ticari enjekte edilebilir ürün örnekleri

ÜRÜN ADI	**ÜRÜN İÇERİĞİ**
Pro-Dense® Enjekte edilebilir rejeneratif greft	%75 Kalsiyum Sülfat +%25 Kalsiyum Fosfat (TCP)
In'Oss™ Enjekte edilebilir kemik grefti	Hidroksiapatit+ Beta-trikalsiyum Fosfat +Hidrojel
Septodont R.T.R Enjekte edilebilir kemik grefti	Beta-trikalsiyum Fosfat
Cerament™ Enjekte edilebilir kemik grefti	Hidroksiapatit+Kalsiyum Sülfat+İyoheksol+salin
Suprabone™ Putty	Beta-trikalsiyum Fosfat + Hidroksipropilmetilselüloz
Norian SRS® (Synthes) Enjekte edilebilir macun	Kalsiyum Fosfat
Vitoss® (Stryker) Enjekte edilebilir kemik grefti	Beta-trikalsiyum Fosfat ve Biyoaktif Cam
ProOsteon® (Biomet) Enjekte edilebilir granül	Koralin Hidroksiapatit ve Kalsiyum Karbonat
Biopex® Enjekte edilebilir kemik çimentosu	Alfa-trikalsiyum Fosfat + Trikalsiyum Fosfat+ Dikalsiyum Fosfat Dihidrat

Tablo 3.3 Ticari enjekte edilebilir ürün örnekleri (devamı)

chronOS Inject® Enjekte edilebilir kemik grefti	Beta-trikalsiyum Fosfat + Hidrojen Fosfat Trihidrat+ Sodyum Hidrojen Pirofosfat+ Monokalsiyum Fosfat Monohidrat
Graftys® QuickSet Enjekte edilebilir kemik çimentosu	Kalsiyum Fosfat Tuzu+ Hidroksi Propil Metil Selüloz
Norian® Skeletal Repair System Enjekte edilebilir kemik grefti	Alfa-trikalsiyum Fosfat + Kalsiyum Karbonat+ Monokalsiyum Fosfat Monohidrat
Kyeron Axoz QS Enjekte edilebilir kemik grefti	Kalsiyum Fosfat
Calcibon® Biomet Enjekte edilebilir kemik grefti	Alfa-trikalsiyum Fosfat + Dikalsiyum Fosfat Dihidrat+ Kalsiyum Karbonat+ Hidroksiapatit
Botiss Maxresorb® inject Enjekte edilebilir kemik grefti	Beta-trikalsiyum Fosfat + Hidroksiapatit

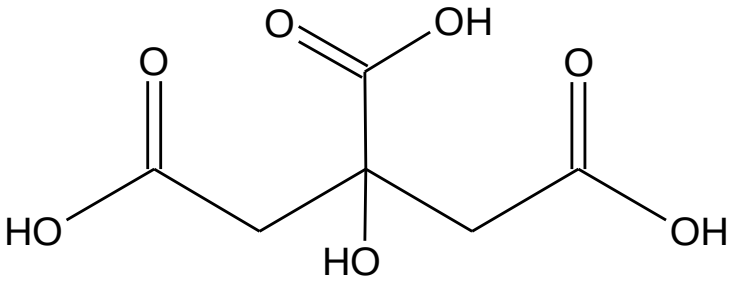
Günümüz araştırmacıları, klinik talebin artmasıyla beraber ilgili alanda çözümlenmesi gereken sorunlar üzerine çalışmalarını sürdürmektedir. Bu sorunların başında enjeksiyonun gerçekleştirilebilmesi için uygulanması gereken minimum kuvvetin sağlanması ve malzemenin enjeksiyona izin verecek ölçüde düşük viskoziteye sahip olması gerekliliği gelmektedir [242]. Ancak, taşıdığı büyük öneme rağmen enjekte edilebilirliği arttırmak amacıyla reolojik özellikleri geliştirmek üzerine yapılmış sistematik çalışmalar oldukça sınırlıdır [241].

Karşılaşılan bir diğer önemli sorun bir önceki çalışmada da bahsedildiği gibi, enjekte edilebilir malzemelerin enjeksiyonu sırasında faz ayrışmasının meydana gelmesidir. Enjekte edilebilir kemik greft malzemesinin kullanıma hazır olabilmesi için yapının stabilitesi oldukça önemlidir. Ancak depolama (raf ömrü) sırasında, parçacıklarda çökme meydana gelebilmektedir. Yaşanan bu durum, enjekte edilebilirlik özelliğini zayıflatmakla birlikte cerrahi uygulamaları zorlaştırmaktadır. Ek olarak, doku

tamirine katkı beklenilenden az olmakla birlikte yeni oluşan dokunun mekanik özellikleri istenileni karşılamamaktadır. Bununla birlikte, enjekte edilebilir kalsiyum fosfat seramikler uygun reolojik özelliklere sahip olmaları durumunda mineral fazın, yüksek hücre geçirgenliği sayesinde dokuya bağlanmasını sağlar [243]. Bu nedenle enjekte edilebilir biyomalzemeler gibi viskoz akışkanlarda partiküllerin çökelmesi (sedimentasyon) ve stabilizasyon ajanlarının kullanımı üzerine yapılan araştırmalar halen devam etmektedir [244].

Organik bir karboksilik asit olan ve biyolojik dokularda da önemli işlevlere sahip **sitrik asit ve tuzları (sitrat) (CA)** doğada, özellikle limon ve portakal gibi turunçgiller olmak üzere, bir çok kaynaktan mantar fermentasyonu veya kimyasal sentez yöntemleriyle elde edilebilmektedir [245]. Memelilerin kemik dokularında da bağlı olarak bulunan sitrat iyonları, kemikteki apatit nanokristallerin kristal kalınlaşmalarını kontrol ederek biyomineralizasyon mekanizmasını düzenlemekte ve stabilizasyon sağlamaktadır [246]. Hayvanlar ve bitkiler aleminde bolca bulunması, mükemmel biyouyumluluğu, ayarlanabilir mekanik özellikleri, kontrol edilebilir bozunma davranışı, toksik olmaması, suda çözünürlüğü ve ucuz olması nedenleriyle *in vitro* ve *in vivo* koşullarda başarıyla uygulanabilecek CA içeren biyomalzemelerin kullanımı, çeşitli yumuşak ve sert doku rejenerasyonu uygulamalarında tercih edilmektedir [247]. Ayrıca, belirtilen özellikleri sebebiyle yalnızca biyomalzeme alanında değil aynı zamanda gıda sektöründe de güvenli olarak kabul edilmektedir [248].

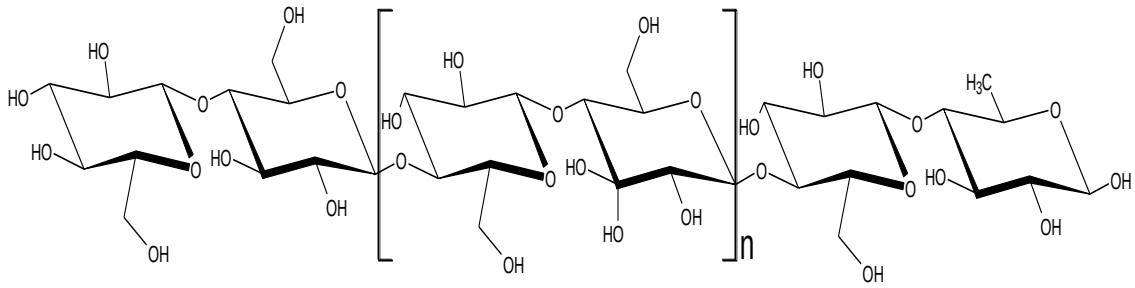
Biyokompozit yapılarda stabilize edici ajan olarak kullanıldığında sitrat iyonları, kalsiyum iyonlarına bağlanarak CaP biyoseramikler üzerine güçlü bir şekilde absorbe olabilme kabiliyeti bulunmaktadır [249]. Sitrik asitin kimyasal yapısı Şekil 3.6'da gösterilmektedir.



Şekil 3.6 Sitrik asitin kimyasal yapısı

Yapısında yüksek miktarda karboksil grupları içeren CA molekülleri, kendilerini TCP parçacıklarının etrafına sararak onlara negatif yük kazandırmakta ve böylece parçacıkların arasında itme kuvvetlerine sebep olmaktadır. Bu durum partiküllerin hareket yeteneklerini arttırarak enjekte edilebilirliği geliştirmekte ve böylece klinik kullanımı kolaylaştırmaktadır [250]. Literatürde yer alan çalışmalardan birinde, CA'nın CaP içeren enjekte edilebilir jel greftin faz stabilitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Hazırlanan grefte ağırlıkça %1,5'in üstünde sitrik asit ilavesiyle viskozitenin arttığı gözlenmiştir. pH 8,5 değerinden 5'e düşürüldüğünde ise süspansiyonun aşırı doygunluğu azalmış ve apatit tanelerinin çökelmesinde önemli bir azalma görülmüştür. Bunun nedeni olarak sitrat iyonlarının TCP seramik tanelerinin yüzeyine kuvvetli bir biçimde adsorbe olması ve tanelerin yüzeyini sararak yüksek negatif yük kazandırması gösterilmiştir. Bu durumun ise parçacıkların birbirini itmesine sebep olduğu (deflokülasyon oluşumu) ve böylece parçacıkların hareket yeteneğinin ve enjekte edilebilirlik özelliğinin geliştiği belirtilmektedir [251].

Ağaç, pamuk, bakteri veya tunikat *(Tulumlular; Clavelina Picta)* gibi bir çok doğal kaynaktan elde edilebilen **selüloz,** üstün mekanik özelliklere sahip, kolayca erişilebilir ve sürdürülebilir bir malzeme olarak ön plana çıkmaktadır [252]. (1-4) glikosidik bağlarla kovalent olarak bağlanmış β-D-glikopiranoz birimlerinden oluşan ve doğrusal bir polimer olarak sınıflandırılan selülozun kimyasal yapısı Şekil 3.7'de gösterilmektedir [253].



Şekil 3.7 Doğrusal bir polimer olan selülozun kimyasal yapısı

Özütlendiği kaynağa ve işleme koşullarına bağlı olarak nanofibrillenmiş selüloz (NFC), nanokristalin selüloz (NCC) veya selüloz nanokristaller (CNC) ve bakteriyel nanoselüloz (BC) gibi farklı formlarda bulunabilen çeşitli nanoselüloz türleri, kimyasal modifikasyona ve gelişmiş morfolojilerin oluşturulmasına imkan sağlamakta ve böylece geniş bir uygulama alanına sahip olmaktadır [254]. Ayrıca, işlevselleştirilme kapasitesine sahip nanoselülozik yapılar ile oluşturulan biyonanokompozit iş birlikleri sayesinde, farklı ölçeklerde üç boyutlu hiyerarşik yapılar oluşturulabilmektedir [255]. Böylece çeşitli polimer matrislerin tek başına kullanımlarına kıyasla malzeme özelliklerinde kayda değer gelişmeler sağlanmaktadır [256]. Yapılan çalışmalarda nanoselüloz biyokompozitlerin özellikle de ortopedik uygulamalarda kemik rejenerasyonu için etkili ve pratik materyaller olduğu kanıtlanmıştır [257].

Nanokristalin selüloz (NCC); bir asit hidroliz prosesi (örneğin; sülfürik asit, fosforik asit veya hidroklorik asit) ile doğal selülozdan izole edilebilen kristalin nanopartiküllerdir. Yüksek yüzey alanı, düşük yoğunluk, iyi mekanik mukavemet, bulunabilirlik, biyolojik olarak parçalanabilirlik, yüksek biyouyumluluk ve toksik olmama gibi özelliklerinden dolayı gittikçe önem kazanmaktadır. Yüksek yüzey alanı/hacim oranı sayesinde hücre bağlanmasını, göçünü, çoğalmasını ve bunlarla birlikte osteokondüksiyonu ve kemik büyümesini desteklemektedir [258], [259]. Bununla birlikte, enjekte edilebilir HA esaslı hidrojel yapıya, nanokompozit elde etmek amacıyla, NCC takviyelendirilen bir çalışmada, HA ve NCC'nin bir arada kullanılması ile daha düzenli ve kompakt bir yapı ve artan NCC oranları ile bozulmaya karşı daha yüksek direnç elde edildiği gözlenmiştir. Ayrıca, geliştirilen

biyonanokompozitlerin yüksek yapısal bütünlüğe sahip olduğu ve *in vitro* koşullarda hücresel aktiviteleri destekleyici özellik sergilediği belirlenmiştir. Bu durumun mikroçevresel materyallerin NCC'nin sülfat grupları ile potansiyel etkişimlerinin bir sonucu olarak düşünülmektedir [260].

Polimer matrisli kompozitlerin özellikleri, matris fazın özellikleri, takviye edilen partiküllerin özellikleri, matris-partikül uygunluğu ve etkileşimi ve partiküllerin dispersiyonu olmak üzere 4 faktöre bağlıdır [261]. Bu nedenle, geliştirilecek enjekte edilebilir greft materyalinin istenen özelliklere sahip olması ve yüksek performans sergilemesindeki en temel zorluklar polimer matris içerisinde diğer partiküllerin homojen dağılımını sağlamak ve iyi bir matris-partikül etkileşimi elde edebilmektir. Çünkü homojen olmayan dağılım nihai ürünün enjekte edilebilirlik veya işlem sonrası mekanik özelliklerini azaltmaktadır. NCC'ler suda kararlı kolloidal dispersiyon oluşturabilir ve bu nedenle suda çözünür veya suda dağıtılabilir polimerlerle birlikte kullanılmak için oldukça uygundur [253]. Yüksek mekanik özellikleri, biyouyumlulukları ve mükemmel kolloidal stabiliteleri nedeniyle, yapısal güçlendirme gerektiren biyomalzeme uygulamalarında NCC yoğun ilgi görmektedir [262]. Enjekte edilebilir kemik greft malzemelerinde alternetif bir stabilizasyon ajanı olarak NCC, yüzeyinde bulundurduğu negatif yüklü sülfat iyonlarının varlığı sayesinde elektrostatik itme kuvvetleri yoluyla sulu süspansiyonda yüksek stabilite sağlamakta ve uniform dağılma özelliğine sahip olmaktadır [253]. Ayrıca, polar –OH gruplarının varlığı hidrofilikliği mümkün kılarken, hidrofobik -CH parçalarının bulunması ise hidrofobik yüzey oluşturmaktadır. Hem hidrofilik hem de hidrofobik özelliklerin bir arada bulunması, NCC'nin bir dağıtıcı olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır [263]. Bir biyopolimer olarak NCC, CA'ya kıyasla daha fazla reaktif gruba sahiptir. Bununla birlikte, yüksek yüzey alanına sahip olan nanoyapısının bağlanma kabiliyetini arttırması beklenmektedir. Bu nedenle, NCC'nin enjekte edilebilir sistemlere ilavesinin, stabilizasyonunu olumlu olarak etkileyeceği düşünülmektedir.

CaP esaslı enjekte edilebilir kemik dolgu malzemelerinde karşılaşılan bir diğer sorun ise tıpkı kemik doku gibi X-ışınlarını geçirmemesidir. Bu durum dolgu

malzemesinin ameliyat sonrasında görüntülenebilmesini zorlaştırmaktadır. Bu sorunu giderebilmek adına çeşitli radyoopaklaştırıcı katkı malzemeleri kullanılmaktadır. Günümüzde biyomalzemeler alanında sıklıkla kullanılan radyoopaklaştırıcı malzemelere örnek olarak **zirkonyum oksit (ZrO_2)** ve baryum sülfat ($BaSO_4$) verilebilir [264], [265]. Radyoopaklaştırıcı ajan seçiminde en önemli parametrelerden biri geliştirilecek ürünün fizikokimyasal ve biyolojik davranışlarını olumsuz yönde etkilemeyecek olmasıdır. Gerçekleştirilen çalışmalar oda sıcaklığında monoklinik, yüksek sıcaklıklarda ise tetragonal kristal yapılara ve yüksek biyouyumluluğa sahip ZrO_2 ilavesinin radyoopaklık sağladığını ve belirtilen özellikler üzerinde istenmeyen bir etki oluşturmadığını kanıtlamaktadır [266], [267]. Bununla birlikte, araştırmalar $BaSO_4$ kullanımının makrofaj-osteoklast farklılaşmasını arttırarak kemik rezorpsiyonunu hızlandırdığını ve osteoliz ile ilişkili olduğunu göstermektedir [268]. Bu nedenle gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında radyoopaklaştırıcı ajan olarak ZrO_2 tercih edilmektedir.

Literatürde ve klinikte elde edilen olumlu sonuçlara rağmen, enjekte edilebilir kemik dolgu malzemelerinin enjeksiyon sırasında karşılaşılabilen seramik partiküllerin aglomerasyonu (faz ayrışması) sorununun iyileştirilmesi ve yapıya radyoopak özellik kazandırılması gerekmektedir. Sunulan tez çalışması kapsamında; faz ayrışması sorununu gideren, radyoopak ve enjekte edilebilir rejeneratif kemik greft malzemesi üretebilmek amacıyla taşıyıcı faz olarak farklı oranlarda polimerik malzemeler ve radyoopaklaştırıcı ajan katılarak rejenerasyonu sağlayacak β-TCP içeren kemik greft malzemesi üretimi yapılması hedeflenmiştir. Ayrıca, ülkemizde kullanılmakta olan mevcut enjekte edilebilir kemik ikameleri çoğunlukla ithal edilmektedir. Yerli üretimin ön plana çıktığı günümüz koşullarında katma değeri yüksek ürünlerin sanayiye katkısı önem arz etmektedir. Bu nedenle gerçekleştirilen tez çalışma kapsamında geliştirilen biyobozunurluk ve biyouyumluluk özelliklerine sahip rejeneratif enjekte edilebilir kemik greft malzemesinin literatüre olduğu gibi yerli üretime de katkı sağlaması beklenmektedir.

4
DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışması kapsamında faz ayrışması sorununun üstesinden gelerek doğrudan klinik kullanıma hazır ve uygulama kolaylığı sağlayan enjekte edilebilir kemik greft malzemesi (IBGM) üretiminin gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. Bu amaca ulaşabilmek için çok fazlı yapıdan oluşmakta olan IBGM'lerin bileşiminde kullanılacak biyoaktif fazın, taşıyıcı polimer jelin ve diğer katkıların optimum özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar aşağıda özetlendiği gibidir:

1. Kullanılacak biyoaktif fazın (β-TCP) sentezi ve karakterizasyonu

2. Taşıyıcı jel sistemi (HA/NCC) sentezi ve karakterizasyonu

3. Radyoopaklaştırıcı ajan (ZrO_2) sentezi ve karakterizasyonu

4. Çeşitli oranlarda toz, jel ve faz kararlılığını sağlamak amacıyla kullanılan stabilizasyon ajanının (CA) biraraya getirilmesiyle IBGM üretimi

5. Faz ayrışması sorunu gideren formülasyonun belirlenmesi

Ayrıca, CA'nın partikül aglomerasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla numuneler CA ilaveli ve ilavesiz olarak hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu bölümde; IBGM üretimi için kullanılan materyal, yöntem, karakterizasyon çalışmaları ve sonuçları ile sonuçların değerlendirilmesi konularında bilgi verilmiştir.

4.1 Materyal ve Yöntem

4.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Cihazlar

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneysel çalışmalarda kullanılan sarf malzemeleri, tedarikçi firma (marka) bilgileri, teknik özellikleri ve kullanım gerekçeleri Tablo 4.1'de verilmektedir.

Tablo 4.1 Kullanılan sarf malzemeleri ve teknik özellikleri

SARF MALZEMESİ	MARKA	TEKNİK ÖZELLİKLER	KULLANIM GEREKÇESİ
Dulbecco's Fosfat Tamponlu Salin	Sigma Aldrich	Modifiye edilmiş, kalsiyum klorür ve magnezyum klorür içermez, sıvı, steril filtreli, hücre kültürü için uygun	HA sentezi için kullanılmıştır.
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma Aldrich	ACS reaktifi, ≥ %99,0 safiyet	HA sentezi için kullanılmıştır.
Polietilen Glikol (PEG)	Sigma Aldrich	PEG-200, sentez için uygun	HA ve ZrO_2 sentezi için kullanılmıştır.
Sodyum Hiyalüronat (HA)	Nishan International Group	1.0 Milyon Dalton	HA sentezi için kullanılmıştır.
Nanokristalin Selüloz (NCC)	Ticari Ürün	Selüloz hidrojen sülfat sodyum tuzu	HA/NCC taşıyıcı jel sentezi için kullanılmıştır.
Sitrik Asit (CA)	Tekkim	Susuz, Ekstra saf	IBGM üretimi için kullanılmıştır.
di-Amonyum Hidrojen Fosfat [$(NH_4)_2HPO_4$]	Sigma Aldrich	ACS reaktifi, ≥ %99,0 safiyet (asidimetrik), katı	β-TCP sentezi için kullanılmıştır.
Kalsiyum Hidroksit [$Ca(OH)_2$]	Sigma Aldrich	Analitik reaktif, ≥ %96 safiyet, toz	β-TCP sentezi için kullanılmıştır.
Amonyum Sülfat [$(NH_4)_2SO_4$]	Sigma Aldrich	≥ %99,0 safiyet	β-TCP sentezi için kullanılmıştır.
Amonyum Hidroksit (NH_4OH)	Sigma Aldrich	Amonyak çözeltisi, %25'lik	β-TCP ve ZrO_2 sentezi için kullanılmıştır.
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma Aldrich	ACS reaktifi, %37'lik	β-TCP ve ZrO_2 sentezi için kullanılmıştır.
Etil Alkol (CH_3CH_2OH)	Sigma Aldrich	Susuz, ≥ %99,5 safiyet	ZrO_2 sentezi için kullanılmıştır.
Zirkonil Nitrat Hidrat [$ZrO(NO_3)_2.xH_2O$]	Sigma Aldrich	%99,0 safiyet	ZrO_2 sentezi için kullanılmıştır.

Deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan tüm cihaz adları, marka-modelleri ve kullanım amaçları Tablo 4.2'de verilmektedir.

Tablo 4.2 Kullanılan alet-teçhizat adları, marka-modelleri ve kullanım amaçları

CİHAZ ADI	MARKA VE MODEL	KULLANIM AMACI
Etüv Fırını	Jp Selecta/2005141	Ürünlerin kurutulması için kullanılmıştır.
Vakum Etüvü	Nüve/EV-018	Ürünün vakum uygulanarak kurutulması için kullanılmıştır.
Sinter Fırını	Protherm	Ürünlerin yüksek sıcaklıkta sinterlenmesi için kullanılmıştır.
Hassas Terazi	AND/GR-200	Kimyasalların hassas bir şekilde tartılabilmesi için kullanılmıştır.
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph Instruments Mr Hei-Standard	Çözeltinin karıştırılması için kullanılmıştır.
Bilyalı Değirmen	MSE Ball Mill	Sentezlenen β-TCP seramik tozlarının öğütülmesi için kullanılmıştır.
Ultrasonik Banyo	Bandelin/RK512H	Yüksek frekansta ses dalgaları ile parçalama işlemi için kullanılmıştır.
pH Metre	Inolab/PH 730	pH ölçümü için kullanılmıştır.
Homojenizatör	Velp	Çözeltinin karıştırılması için kullanılmıştır.
Mekanik Karıştırıcı	Wise Stir HS-100D	Çözeltinin karıştırılması için kullanılmıştır.
Vorteks	Stuart-Vortex Mixer SA8	Kuvvetli titreşim altında karıştırma sağlanması için kullanılmıştır.
Speed Mixer	SpeedMixer DAC 150.1	IBGM üretiminde homojen karıştırma sağlanması için kullanılmıştır.
Ultra Saf Su Cihazı	Ultra Pure (Type 1) Water/Direct-Q 3UV	Tip 1 saf suyun elde edilebilmesi için kullanılmıştır.

4.1.2 Beta-Trikalsiyum Fosfat (β-TCP) Biyoseramik Toz Sentezi

Optimum özelliklere sahip β-TCP biyoseramik toz sentezini gerçekleştirmek amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden, kimyasal çöktürme, sol-jel, hidrotermal, hidroliz, biyomimetik, mikrodalga destekli çöktürme ve mekanik sentez en önemli olanlarıdır [269], [270], [271], [272], [273], [274]. Bununla birlikte, bu yöntemlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin; mikrodalga destekli çöktürme yöntemi fazla ekipman gerektirirken, mekanik sentez yöntemi ise yüksek enerji tüketimi ve zaman gereksinimi nedeniyle maliyeti arttırmaktadır. Ayrıca, öğütme işlemi sırasında ürün safiyetinde azalma meydana gelebilmektedir. Hidrotermal yöntem gerekli üretim maliyetini arttırırken, hidroliz yöntemi ise kullanılacak kimyasal miktarı daha az olmasına rağmen hidrotermal yöntemde olduğu gibi yüksek maliyetlidir [275], [276].

β-TCP sentezi için kolay, uygun maliyetli ve yüksek safiyette ürün eldesine olanak sağlayan bir yöntem tercih edilmesi, üretim verimliliği ve ekonomiklik açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, diğer yöntemlere kıyasla daha kolay uygulanabilen ve istenilen saflıkta ürün eldesine olanak sağlayan "kimyasal çöktürme yöntemi" ön plana çıkmaktadır [277], [278]. Bu yöntemde β-TCP doğrudan çöktürülemez ancak ısıl işlem sırasında Ca/P mol oranı 1,33-1,65 arasında değişen stokiyometrik olmayan bir apatitten dönüştürülebilir. [$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ $(0 \leq x \leq 1)$] formülüne sahip stokiyometrik olmayan apatit, stokiyometrik HAp'ye benzer kristal yapı sergilemektedir. Stokiyometrik olmayan apatitin HAp ve β-TCP'ye dönüştürülmesi ısıl işlem uygulanarak Reaksiyon (4.1)'e göre gerçekleşmektedir.

$$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x} = Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + \beta\text{-}Ca_3(PO_4)_2 + xH_2O \qquad (4.1)$$

Ca/P molar oranı 1,5 ve x=1 olduğunda Reaksiyon (1)'e göre kimyasal olarak β-TCP'ye benzeyen Ca-eksik hidroksiapatit (CDHA), [$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)$] elde edilmektedir. CDHA'nın ısıl işlem yoluyla β-TCP'ye kimyasal dönüşümü Reaksiyon (4.2)'de gösterilmektedir [279].

$$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH) = 3Ca_3(PO_4)_2 + H_2O \qquad (4.2)$$

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında; β-TCP biyoseramik tozunun sentezi için "Kimyasal Çöktürme Yöntemi" kullanılmıştır. Ayrıca, üretilecek β-TCP'nin fiziksel yapısının hedeflenen özellikleri sağlaması amacıyla sentez parametrelerinin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.1 β-TCP Biyoseramik Tozu Sentezi Optimizasyon Çalışmaları

Ana çözeltinin hazırlanması (Çözelti 1): Belirlenen miktarda $Ca(OH)_2$ hassas terazide tartılır. 500 ml'lik bir beher içerisine 80-120 mL ultrasaf su ve tartılan $Ca(OH)_2$ ilave edilir. Elde edilen çözeltinin pH'ı belirlenir (~pH 12). Hazırlanan çözelti, manyetik karıştırıcıda karıştırma işlemine tabi tutularak çözeltinin pH değeri HCl ilavesi ile hedeflenen pH değerine sabitlenir. β-TCP sentezi sırasında gerçekleştirilen pH ayarlama işlemi Şekil 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1 β-TCP sentezi sırasında pH ayarlama işlemi

di-amonyum hidrojen fosfat çözeltisinin hazırlanması (Çözelti 2): Ayrı bir 300 mL'lik behere hassas terazide yeterli miktarda tartılan $(NH_4)_2HPO_4$ ve 80-120 mL ultrasaf su ilave edilerek ultrasonik banyoda tamamen çözünmesi sağlanır. Çözelti 1 ve Çözelti 2'ye ait görüntüler Şekil 4.2'de verilmektedir.



Şekil 4.2 Çözelti 1 ve Çözelti 2'ye ait görüntüler

Hazırlanan çözelti (Çözelti 2) dakikada 2-5 mL olacak şekilde Çözelti 1'e ilave edilir. Bu esnada karıştırma işlemine devam edilir. İşlem boyunca NH_4OH ilavesiyle pH değeri sabit tutulur veya Çözelti 2'nin tamamen ilave edilmesinin ardından NH_4OH ilavesiyle pH hedeflenen değere sabitlenir. Elde edilen çözelti karıştırma işlemine tabi tutularak yaşlandırmaya bırakılır. Yaşlandırma süresinin sonunda dekantasyon işlemi ile katı ve sıvı fazlar ayrıştırılır. Son çözelti vakumlu filtrasyon işlemi uygulanarak süzüldükten sonra 80°C'de etüv içinde 24 saat kurutma işlemine tabi tutulur. Elde edilen CDHA'ya ait filtre kekinin görüntüsü Şekil 4.3'te verilmektedir.



Şekil 4.3 CDHA'ya ait filtre kekinin görüntüsü

Kurutma sonrası sentezlenen biyoseramik tozu sinter fırınında 1100°C sıcaklıkta sinterleme işlemine tabi tutulur. Son olarak elde edilen nihai ürün (β-TCP) agat havanda öğütülerek numune kaplarına yerleştirilir. Sinterleme sonrası β-TCP biyoseramik tozuna ait görüntü Şekil 4.4'te verilmektedir.



Şekil 4.4 Sinterleme sonrası β-TCP biyoseramik tozu

Uygulanan reçeteler arasından öğütülebilirliği uygun β-TCP biyoseramik tozlarının kimyasal ve morfolojik özellikleri SEM, XRD ve FTIR yöntemleri ile belirlenmiştir.

β-TCP biyoseramik tozu sentez reçetelerine ait işlem basamaklarına ait detaylı bilgi Tablo 4.3'te özetlenmiştir.

Tablo 4.3 β-TCP biyoseramik tozu sentez reçetelerine ait işlem basamakları

REÇETE NO	SENTEZ BASAMAKLARI	NUMUNE KODU	SONUÇ
R1	1. Uygun miktarda $Ca(OH)_2$ tartılır. 2. 100 mL ultra saf su eklenerek Çözelti 1 hazırlanır. 3. Manyetik karıştırma yapılır. 3. %37'lik HCl ile pH 12'den pH 7'ye ayarlanır. 4. Uygun miktarda $(NH_4)_2HPO_4$ tartılır ve 100 mL ultra saf su ile karıştırılır (Çözelti 2). 5. Hazırlanan çözelti kontrollü olarak Çözelti 1'e ilave edilir. 6. Aynı anda amonyak ilavesi ile pH 7 değerinde sabit tutulur. 7. 1 saat ve 24 saat süreli yaşlandırma ardından süzme işlemi gerçekleştirilir ve numuneler 80°C etüvde kurutulur.	**R1-1:** pH 7, 1 saat yaşlandırma **R1-24:** pH 7, 24 saat yaşlandırma	Öğütme işlemine uygun olmayan çok sert bir yapı elde edilmiştir.

Tablo 4.3 β-TCP biyoseramik tozu sentez reçetelerine ait işlem basamakları (devamı)

R2	1. Uygun miktarda $Ca(OH)_2$ tartılır. 2. 100 mL ultra saf su eklenerek Çözelti 1 hazırlanır. 3. Manyetik karıştırma yapılır. 3. %37'lik HCl ile pH 12'den pH 8'e ayarlanır. 4. Uygun miktarda $(NH_4)_2HPO_4$ tartılır ve 100 mL ultra saf su ile karıştırılır (Çözelti 2). 5. Hazırlanan çözelti kontrollü olarak Çözelti 1'e ilave edilir. 6. Aynı anda amonyak ilavesi ile pH 8 değerinde sabit tutulur. 7. 1 saat ve 24 saat süreli yaşlandırma ardından süzme işlemi gerçekleştirilir ve numuneler 80°C etüvde kurutulur.	**R2-1:** pH 8, 1 saat yaşlandırma **R2-24:** pH 8, 24 saat yaşlandırma	Öğütme işlemine uygun olmayan çok sert bir yapı elde edilmiştir.
R3	1. Uygun miktarda $Ca(OH)_2$ tartılır. 2. 100 mL ultra saf su eklenerek Çözelti 1 hazırlanır. 3. Manyetik karıştırma yapılır. 3. %37'lik HCl ile pH 12'den pH 7'ye ayarlanır. 4. Uygun miktarda $(NH_4)_2HPO_4$ tartılır ve 100 mL ultra saf su ile karıştırılır (Çözelti 2). 5. Hazırlanan çözelti kontrollü olarak Çözelti 1'e ilave edilir. 6. pH düşüşü gerçekleşmesinin ardından amonyak ilavesi ile pH 7 değerine yükseltilir. 7. 1 saat ve 24 saat süreli yaşlandırma işlemleri ardından süzme işlemi gerçekleştirilir ve numuneler 80°C etüvde kurutulur.	**R3-1:** pH 7, 1 saat yaşlandırma **R3-24:** pH 7, 24 saat yaşlandırma	Öğütme işlemine uygun hedeflenen sertlikte bir yapı elde edilmiştir.
R4	1. Uygun miktarda $Ca(OH)_2$ tartılır. 2. 100 mL ultra saf su eklenerek Çözelti 1 hazırlanır. 3. Manyetik karıştırma yapılır. 3. %37'lik HCl ile pH 12'den pH 5,8'e ayarlanır. 4. Uygun miktarda $(NH_4)_2HPO_4$ tartılır ve 100 mL ultra saf su ile karıştırılır (Çözelti 2). 5. Hazırlanan çözelti kontrollü olarak Çözelti 1'e ilave edilir. 6. pH düşüşü gerçekleşmesinin ardından amonyak ilavesi ile pH 5,8 değerine yükseltilir. 7. 1 saat yaşlandırma ardından süzme işlemi gerçekleştirilir ve numuneler 80°C etüvde kurutulur.	**R4-1:** pH 5,8, 1 saat yaşlandırma	Öğütme işlemine uygun hedeflenen sertlikte bir yapı elde edilmiştir.

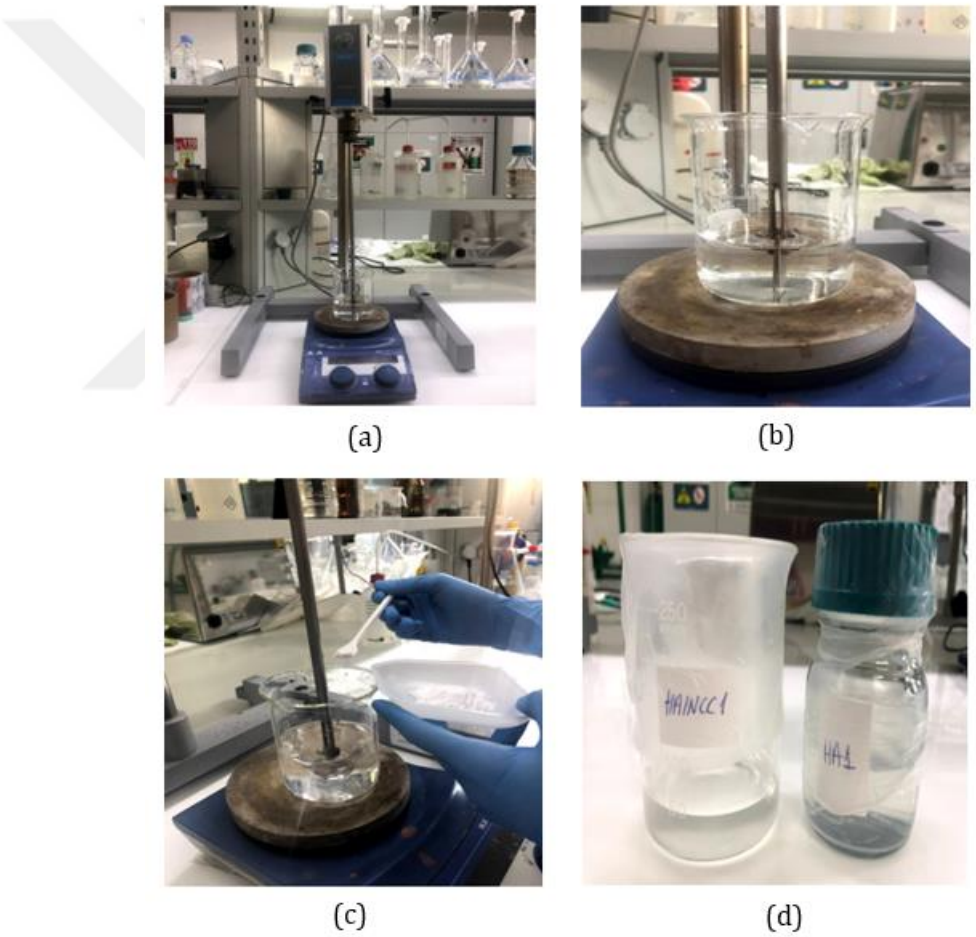
Hedeflenen özelliklere (öğütülebilirlik) sahip β-TCP biyoseramik tozlarının kimyasal ve morfolojik özelliklerinin karakterize edilmesinin ardından uygunluğu

belirlenen biyoseramik tozu, HA/NCC taşıyıcı jel sistemine farklı oranlarda eklenerek enjekte edilebilir greft üretimi gerçekleştirilmiştir.

4.1.3 Hiyalüronik Asit/Nanokristalin Selüloz (HA/NCC) Jellerin Hazırlanması

4.1.3.1 HA Jel Sentezi

HA jel sentezi için öncelikle 0,5 M fosfat tamponlu salin çözeltisi hazırlanır. Bunun için yeterli miktarda Dulbecco's fosfat tamponlu salin tozu, 250 mL'lik bir beher içerisinde mekanik karıştırma altında 100 mL ultrasaf suya ilave edilir. Üzerine hassas terazide tartılan %99'luk NaCl tuzu ve PEG-200 ilave edilerek homojen çözelti elde edilene kadar mekanik karıştırıcıda karıştırılır.



Şekil 4.5 (a, b) Mekanik karıştırma altında gerçekleştirilen HA jel sentezi, (c) sodyum hiyalüronat tozunun kontrollü olarak ilavesi ve (d) nihai ürün örnekleri

Yeterli miktarda sodyum hiyalüronat tozu hassas terazide tartılır ve kontrollü olarak karıştırılmakta olan çözeltiye ilave edilir. Mekanik karıştırma altında gerçekleştirilen HA jel sentezine (a, b), sodyum hiyalüronat tozunun kontrollü olarak ilavesine (c) ve nihai ürün örneklerine (d) ait görüntüler Şekil 4.5'te gösterilmektedir. Nihai çözelti karıştırma olmaksızın 30 dakika boyunca yaşlandırılır.

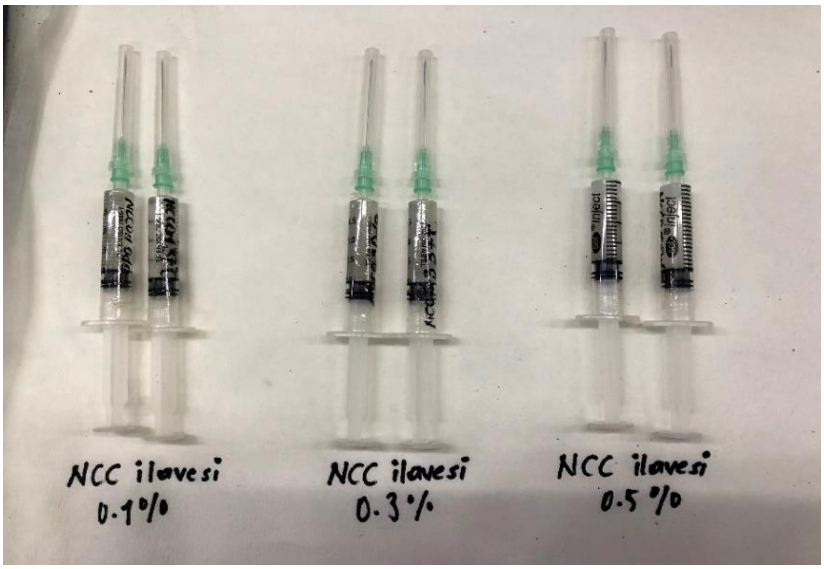
4.1.3.2 HA/NCC Jelin Hazırlanması

Ağırlıkça %0,1, %0,3 ve %0,5 oranlarında NCC takviyeli taşıyıcı faz sistemlerini hazırlamak ve optimum oranı belirlemek amacıyla kullanılan HA jel ve NCC miktarları Tablo 4.4'de verilmektedir.

Tablo 4.4 HA/NCC taşıyıcı jel oranları

TAŞIYICI JEL KODU	NCC MİKTARI (g)	HA JEL MİKTARI (mL)
J1	0,01	10
J2	0,03	10
J3	0,05	10

Tablo 4.4'te verilen NCC ve HA jel miktarları doğrultusunda; önceden hazırlanmış olan HA jelden 10'ar mL alınarak santrifüj tüplerine eklenmiş ve üzerine sırasıyla 0,01, 0,03 ve 0,05 g NCC ilave edilmiştir. Karıştırma işlemi, vortex cihazı kullanılarak homojen yapı elde edilene kadar gerçekleştirilmiştir. Farklı oranlarda HA/NCC içeren nihai jeller enjektörlere aktarılmıştır. Farklı oranlarda HA/NCC nihai jellere ait görüntü Şekil 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.6 Farklı oranlarda HA/NCC içeren nihai jeller

Son olarak elde edilen jellerin faz kararlılığının belirlenmesi amacıyla zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

4.1.4 Zirkonyum Oksit (ZrO_2) Radyoopaklaştırıcı Ajan Sentezi

Radyoopaklaştırıcı ajan olarak kullanılacak ZrO_2'nin sentezi için "Kimyasal Çöktürme Yöntemi" uygulanmıştır [280], [281]. Ardından farklı kurutma parametrelerinin ZrO_2'nin morfolojik ve aglomerasyon özelliklerine etkisini belirlemek amacıyla döndürerek kurutma (rotary), dondurarak kurutma (liyofilizatör) ve kurutma fırını (etüv) kullanılmıştır.

4.1.4.1 ZrO_2 Sentezi İşlem Basamakları

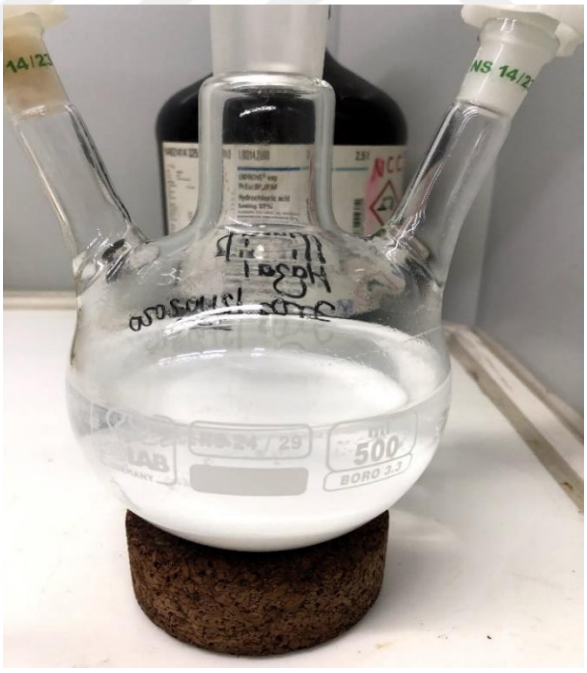
Yeterli miktarda $ZrO(NO_3)_2.xH_2O$, 1:4 oranında hazırlanmış olan su:etanol çözeltisi içerisinde çözündürülür. Elde edilen asidik çözeltiye ağırlıkça %1'lik PEG çözeltisi ilave edilir. 50°C'de 2 saat süresince manyetik karıştırma işlemi yapılır.

Bu süre boyunca NH_4OH ilavesiyle pH 9 değerinde sabit tutulur. Manyetik karıştırma altında gerçekleştirilen ZrO_2 sentezine ait görüntü Şekil 4.7'de verilmektedir.



Şekil 4.7 Manyetik karıştırma altında gerçekleştirilen ZrO_2 sentezi

Elde edilen çözelti 24 saat süre ile yaşlanmaya bırakılır. Yaşlanma süresinin ardından tam çökelme oluştuktan sonra dekantasyon işlemi gerçekleştirilir. ZrO_2 sentezine ait yaşlandırma işlemi sonrası çökelti oluşumuna ait görüntü Şekil 4.8'de gösterilmektedir.



Şekil 4.8 ZrO_2 sentezine ait yaşlandırma işlemi

Elde edilen çökelti içerisindeki sıvı faz, mavi bant filtre kağıdı kullanılarak vakumlu filtrasyon işlemiyle süzülür. Ardından, kurutma gerçekleştirilir ve sonrasında agat havanda öğütme uygulanır. Öğütülen toz krozelere yerleştirilerek sinter fırınında 1100°C'de 2 saat sinterlenir.

4.1.4.2 Farklı kurutma yöntemlerinin uygulanması

Kimyasal çöktürme işleminin ardından, kurutma koşullarının ZrO_2 partiküllerinin morfolojik özellikleri ve aglomerasyon eğilimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla farklı prosesler kullanılarak numuneler kurutulmuştur.

Zirkonya biyoseramik tozlarının farklı kurutma prosesleri (a) etüv, (b) rotary ve c) liyofilizatör kurutma Şekil 4.9'da verilmiştir.



(a) (b) (c)

Şekil 4.9 Zirkonya biyoseramik tozlarının farklı kurutma prosesleri (a) etüv, (b) rotary ve (c) liyofilizatör kurutma

- **Etüv Kurutma**

Çöken numune etüv içinde (JP Selecta, 2005141) 80°C sıcaklıkta 12 saat süreyle kurutulur. Ardından, numune agat havanda öğütülür. Son olarak numune sinterleme fırınında (Protherm, Yüksek Sıcaklık) 1100°C'de 2 saat sinterlenir.

- **Rotary Kurutma**

Dekante edilmiş numune rotary balonuna aktarılır (Buchi Rotary Evaporatör, Rotavapor R-300). Rotary kurutma parametreleri (süre=4 saat, dönüş hızı=80 rpm, ısıtma banyosu= 37^{o}C ve chiller= 5^{o}C olarak ayarlanır. Rotary balonu, jelleşme oluşana kadar tek yönlü olarak döndürülür. Jelleşmeden sonra kurutma moduna geçilerek çift yönlü dönüş gerçekleştirilir. Kurutulmuş numune öğütüldükten sonra 1100°C'de 2 saat sinterlenir.

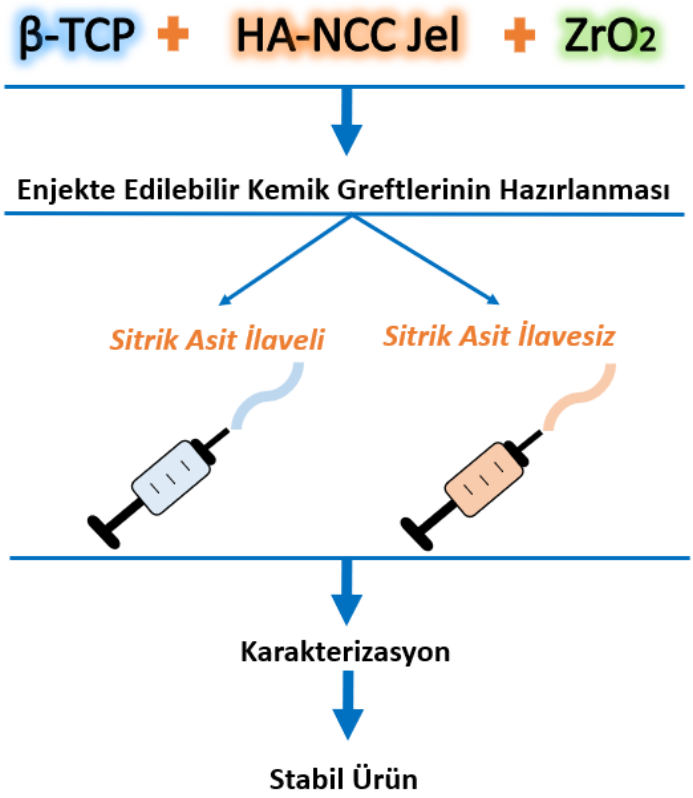
- **Liyofilizatör Kurutma**

Liyofilizasyon işlemi (Beijer Electonics, HT 40), numunenin tamamen kurumasını sağlayacak şekilde 0.5-0.8 mbar'lık vakum altında ve -70^{o}C'de 24 saat süreyle gerçekleştirilir. Son olarak liyofilize toz öğütülür ve 1100°C'de 2 saat sinterlenir.

Elde edilen numunelerin kimyasal ve morfolojik özellikleri SEM, XRD, FTIR, Zeta Tane Boyutu ve Potansiyel ölçümleri ile karakterize edilmiştir.

4.1.5 Enjekte Edilebilir Greft Malzemelerinin (IBGM) Hazırlanması

Zeta potansiyel değerleri ölçülerek en yüksek stabiliteye sahip HA/NCC jel oranı %0,1 olarak belirlenmiş olup, deneysel çalışmalar bu taşıyıcı sistem kullanılarak sürdürülmüştür. Enjekte edilebilir kemik greft malzemeleri üretim şeması Şekil 4.10'da gösterilmektedir.



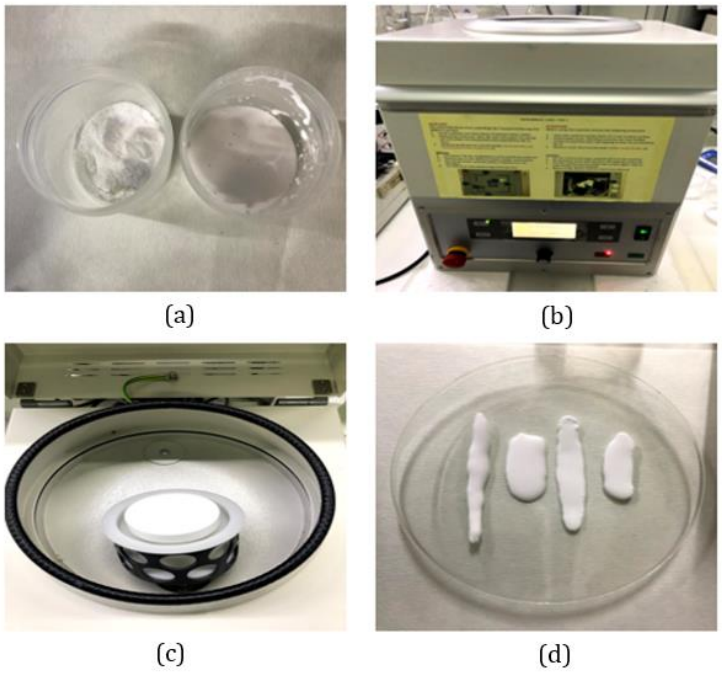
Şekil 4.10 Enjekte edilebilir kemik greft malzemeleri üretim şeması

Enjekte edilebilir greft üretimi, sentezlenen β-TCP biyoseramik tozu, HA/NCC taşıyıcı jel, CA deflokülasyon ajanı ve ZrO_2 radyoopaklaştırıcı ajanının Tablo 4.5'te verilen oranlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.5 Enjekte edilebilir greft üretimine ait deneysel parametreler

NUMUNE NO	β-TCP/TAŞIYICI JEL ORANI	RADYOOPAKLAŞTIRICI AJAN ORANI (%)	SİTRİK ASİT MİKTARI (%)
IBGM 1	50:50	1	-
IBGM 2	50:50	1	0,5
IBGM 3	40:60	1	-
IBGM 4	40:60	1	0,5
IBGM 5	35:65	1	-
IBGM 6	35:65	1	0,5
IBGM 7	25:75	1	-
IBGM 8	25:75	1	0,5

Tablo 4.5'te belirtilen oranlar doğrultusunda; 10'ar mL HA/NCC taşıyıcı jel sistemlerine (J1) öncelikle belirtilen miktarda deflokülasyon ajanı ve radyoopaklaştırıcı ajan kontrollü olarak ilave edilmiş ve homojen yapı elde edilene kadar kuvvetli titreşim altında vorteks kullanılarak karıştırılmıştır. Ardından, verilen oranlarda β-TCP biyoseramik tozu Speed Mixer cihazı kullanılarak 2000 rpm döndürme hızında 5 dk boyunca jel faz ile karıştırılarak IBGM ürünler hazırlanmıştır. Nihai ürünler depolama amacıyla enjektörlere aktarılmıştır. IBGM üretimine ait görüntü; (a) SpeedMixer cihazı kullanımı öncesi toz ve toz+jel, (b ve c) SpeedMixer uygulaması ve (d) karıştırma sonrası enjekte edilen IBGM Şekil 4.11'de verilmektedir. Üretimi gerçekleştirilen ürünlerden stabilitesi en yüksek olan enjekte edilebilir sahip greft malzemesi zeta potansiyel ölçümü ile belirlenmiştir. Seçilen ürünün kimyasal özellikleri FTIR, TGA, ICP-MS yöntemleriyle ve morfolojik özellikleri ise SEM ile belirlenmiştir. Ayrıca enjekte edilebilirlik özelliklerini belirlemek amacıyla reometre ile viskozite ölçümleri yapılmıştır. Son olarak, gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında üretilen nihai ürüne ait biyouyumluluğun belirlenmesi amacıyla hücre kültürü çalışması yapılmıştır.



Şekil 4.11 IBGM üretimi; (a) SpeedMixer cihazı kullanımı öncesi toz ve toz+jel, (b ve c) SpeedMixer uygulaması ve (d) karıştırma sonrası enjekte edilen IBGM

4.2 Karakterizasyon Çalışmaları İçin Numune Hazırlama Analiz Protokolleri

4.2.1 Stabilizasyon

Faz kararlılığını belirlemek amacıyla numuneler hava sızdırmayacak şekilde enjektörlere doldurulmuştur. Ardından, oda sıcaklığında ve 37^{o}C sıcaklıkta olmak üzere depolanarak enjekte edilebilir greftlerin stabilitesi 1. saat, 1. gün, 1. hafta, 2. hafta ve 1. ay olmak üzere farklı zaman aralıklarında gözlemlenmiştir.

4.2.2 Tane Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Işınların saçılma davranışına bağlı zeta tane boyutları, partiküllerin yüzey yükleriyle ilişkili zeta potansiyelleri ve polidispersite değerleri Malvern ZSP-Zeta Sizer cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Her ölçüm ortalama değer belirlenmesi amacıyla üçer kez tekrarlanmıştır.

4.2.2.1 ZrO_2 Radyoopaklaştıcı Ajanı Tane Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü Protokolü

Farklı koşullarda kurutulmuş toz numuneler çözelti konsanstrasyonu ağırlıkça % 0,1 olacak şekilde hazırlanmış ve ultrasonik karıştırmaya tabi tutulmuştur.

4.2.2.2 Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi Zeta Potansiyel Ölçümü Protokolü

Enjekte edilebilir yapının faz kararlılığını belirlemek amacıyla ölçüme hazır süspansasyon hazırlanmıştır. Bu doğrultuda; test edilecek çözelti konsanstrasyonu ağırlıkça % 0,3 olacak şekilde hazırlanmış ve ultrasonik karıştırıcıda homojen yapı elde edilene kadar karıştırılmıştır.

4.2.3 X-Işını Kırınımı (XRD)

Numunelerin kristallografik özellikleri ve içerdikleri fazlar X-Işını Difraktometresi (Polikristal XRD, PANalytical X'Pert PRO) kullanılmıştır.

4.2.3.1 β-TCP Biyoseramik Tozu XRD Protokolü

Tarama Cu-Kα radyasyonu kullanılarak, 20-60° 2θ aralığında ve tarama hızı 1°/dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.2 ZrO_2 Radyoopaklaştıcı Ajanı XRD Protokolü

Tarama Cu-Kα radyasyonu kullanılarak, 20-90° 2θ aralığında ve tarama hızı 1 °/dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2.4 Taramalı Elektron Mikroskobisi (SEM-EDS)

Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss EVO® LS 10) (numunelerin bileşimiyle ilgili niteliksel faz dağılımı ve kristal yapısı) ve niceliksel (Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDS)) verilerin elde edilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

4.2.4.1 β-TCP Biyoseramik Tozu ve ZrO_2 Radyoopaklaştıcı Ajanı SEM-EDS Protokolü

Kurutma ve yüksek sıcaklıkta sinterleme işlemi gerçekleştirilmiş β-TCP ve ZrO_2 toz numunelerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobisi kullanılarak 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerde görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme öncesi numuneler altın-paladyum iletken metal ile kaplanmıştır.

4.2.4.2 Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi SEM-EDS Protokolü

Faz ayrışması sergilemeyen enjekte edilebilir jel ürün, 37°C'de düşük vakum koşullarına tabi tutularak fazla nemin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Görüntüleme öncesi numuneler altın-paladyum iletken metal ile kaplanmıştır. Hazırlanan numunenin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerde görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

4.2.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR spektroskopisi, sıvı veya katı numunelerin sahip oldukları belirli fonksiyonel grupların varlığını tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu sayede belirli bir

dalga boyu aralığında piklerin yeri, yoğunluğu ve genişliği hakkında bilgiler elde edilebilmekte olup, faz kompozisyonu belirlenebilmektedir.

4.2.5.1 β-TCP Biyoseramik Tozu ve ZrO_2 Radyooapaklaştıcı Ajanı FTIR Protokolü

Ölçüm aralığı 650 cm^{-1} ile 4000 cm^{-1} dalga boyunda olan ve yüksek çözünürlükte spektrum eldesine olanak tanıyan Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR cihazı ile analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz için 5'er mg miktarlarında toz numuneler kullanılmıştır.

4.2.5.2 HA/NCC jel ve Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi FTIR Protokolü

Optimum oranlara sahip HA/NCC jel ve geliştirilen enjekte edilebilir greft numunelerin içerdiği kimyasal bağların tespit edilmesi amacıyla, 5'er mL jel ve 5'er mg kurutulmuş numune Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR cihazı ile analiz edilmiştir.

4.2.6 Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS)

ICP-MS analizi numunelerin sahip oldukları elementlerin ve ağır metallerin tayini amacıyla kullanılmaktadır. Çalışmalar kapsamında Shimadzu Agilent 7700 ICP-MS cihazı kullanılarak elemental tayin gerçekleştirilmiştir.

4.2.6.1 Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi ICP-MS Protokolü

Analiz edilecek numune ön hazırlık işlemine tabi tutularak, toplanan süpernatanlar ile analiz gerçekleştirilmiştir.

4.2.7 Termal Analiz (Termogravimetrik analiz (TGA)- Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC))

Termogravimetrik analiz, kontrollü atmosfer koşullarında sıcaklığa ve zamana bağlı olarak malzemede meydana gelen kütle kayıp ve kazanımlarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Diferansiyel taramalı kalorimetrede ise sıcaklığa veya zamana bağlı olarak soğurulan veya salınan enerji miktarı ölçülmektedir. Deneysel çalışmalar kapsamında geliştirilen enjekte edilebilir greft malzemesinin bozulma davranışı ve ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla yaş ve 37°C'de düşük vakum koşullarında elde edilen kuru numunelere TGA ve DSC karakterizasyon yöntemleri

uygulanmıştır. Analiz Perkin Elmer STA 6000 cihazı ile, 10°C/dk ısıtma hızında 25 - 950°C arası ve hava koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.8 Reometre Analizi

Sentezlenen enjekte edilebilir greftlerin reolojik özelliklerini belirlemek amacıyla Anton Paar MCR 302 reometre cihazı kullanılarak viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.9 Hücre Kültürü Çalışması (MTT- In Vitro Sitotoksisite/Hücre Canlılığı Testi)

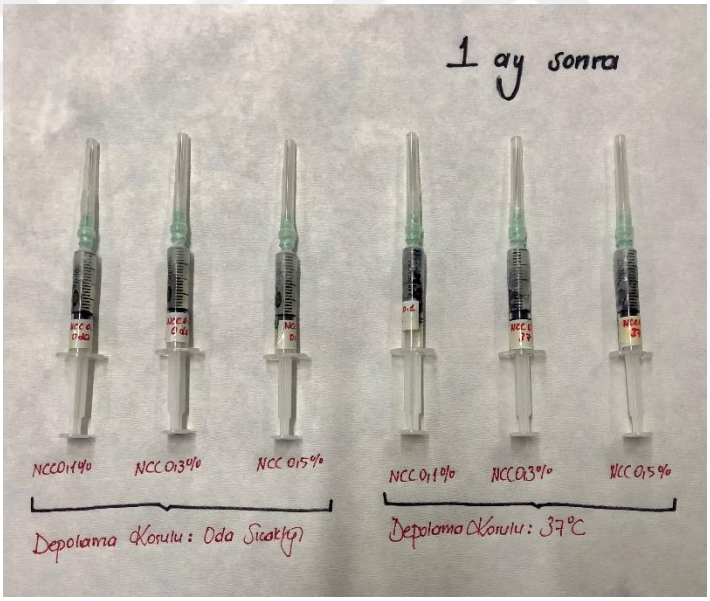
Optimum oranlara ve faz kararlılığına sahip enjekte edilebilir ürüne hücre kültürü çalışması yapılması amacıyla ISO 10993-5 standardına (Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- bölüm 5: Vücut dışı sitotoksisite deneyleri) uygun olarak Yıldız Teknik Üniversitesi-Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde sitotoksisite testi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen enjekte edilebilir biyokompozit malzeme hücre kültürü çalışması öncesi otoklav sterilizasyona tabi tutulmuştur.

İlgili standardın önerdiği şekilde L-929 (L hücresi, L suşu türevi) fare fibroblast hücre hattı (NCTC klon 929, ATCC, ABD) kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plaka içerisine hücre hattı her kuyuda 10^5 hücre/mL olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat süre ile 37 ^oC'de CO_2 bulunan ortamda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonunda 90 mg sterilize edilmiş enjekte edilebilir greft malzemesi 22 mL Dulbecco's minimal esansiyel ortamında (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium, DMEM) dağıtılarak 8 tekrarlı olacak şekilde kuyulara eklenmiştir. Ardından, kuyulara MTT canlılık testi yapılmak üzere MTT solüsyonu [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür] eklenerek renk değişimi gözlenmiş ve çoklu pleyt okuyucuda fotometrik ölçüm yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak %1 fenol çözeltisi ve negative kontrol olarak sadece DMEM ortamı kullanılmıştır. Fotometrik okuma 570 nm'de gerçekleştirilmiştir. Absorbansların belirlenmesinin ardından kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilerek deneysel çalışmalar kapsamında geliştirilen optimum özelliklere sahip enjekte edilebilir greftin (%) hücre canlılığı hesaplanmıştır.

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Stabilizasyon Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Hava almayacak şekilde enjektörlere doldurularak oda sıcaklığında ve 37°C'de depolanan HA/NCC jeller 1. saat, 1. gün, 1. hafta, 2. hafta ve 1. ay olmak üzere farklı zaman aralıklarında kontrol edilmiş olup gözle görülür bir faz ayrışması meydana gelmediği tespit edilmiştir. Bu durum NCC'nin HA içerisinde çökelmeden kararlılığını koruyabildiğini temsil etmektedir. Birinci ay sonunda oda sıcaklığında ve 37°C'de depolanan HA/NCC jellere ait görüntü Şekil 5.1'de gösterilmektedir. Yapılan gözlemin ardından en yüksek kararlılığa sahip numunenin belirlenmesi amacıyla zeta potansiyel ölçümü gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.1 Bir ay boyunca farklı koşullarda depolanan HA/NCC jeller

İkinci aşama olarak belirlenen optimum HA/NCC jele farklı oranlarda β-TCP, ZrO_2 ve CA ilavesi gerçekleştirilmiş, numunelerin stabitesi gözlenmiş ve artan jel miktarları ile faz ayrımı sergileme eğiliminin arttığı tespit edilmiştir. 25:75, 35:65, 40:60 ve 50:50 CA ilaveli/CA ilavesiz olarak hazırlanan 8 adet numuneden

50:50 jel/toz oranlarına sahip numuneler hariç diğer 6 numunede partikül aglomerasyonu meydana geldiği belirlenmiştir. CA ilaveli ve ilavesiz 50:50 jel/toz oranlarına sahip numuneler (IBGM 1 ve 2) CA ilavesinin kararlılığa etkisini değerlendirmek amacıyla zeta potansiyel ölçümüne tabi tutulmuştur.

5.2 Tane Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kolloidal süspansiyonlar, özellikle de biyomalzeme endüstrisinde yaygın kullanıma sahiptir. Bu nedenle, süspansiyonların dispersiyonu, homojenliği ve stabilizasyonu kullanım amacına da bağlı olarak önem kazanmaktadır [282]. Zeta tane boyutu numune üzerine lazer ışınları gönderilmesi ile yansıyan ve kırılan ışınların dedektörler ile incelenmesi prensibine dayanır. Işınların açısı ve şiddeti numunenin parçacık boyut dağılımını belirler. Ayrıca partiküller içerisinden geçen ışınların saçılma açısı da parçacık boyutuna bağlıdır. Zeta potansiyel değeri ise, partiküllerin yüzey yükünü temsil etmekte olup, enjekte edilebilir çok fazlı yapının uzun vadeli stabilitesini ifade etmektedir. Literatürdeki çalışmalarda da belirtildiği üzere bir süspansiyonun mutlak zeta potansiyeli ne kadar büyükse itme kuvveti o kadar fazla ve partikül süspansiyon sistemi o kadar kararlı demektir [260], [263], [283].

Partikül boyut aralığı ve dağılımlarını tanımlamak amacıyla değerlendirilen bir diğer parametre ise polidispersite indeksi (PDI) olup homojen olmama derecesini tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu indeks boyutsuzdur ve 0,05'ten küçük değerler yüksek oranda tek dağılımı (homojenliği) ifade etmektedir. 0,7'den büyük PDI değerleri ise, numunenin çok geniş bir partikül boyutu dağılımına (heterojen) sahip olduğunu ve dinamik ışık saçılımı tekniği ile analiz edilmeye uygun olmadığını göstermektedir [284].

5.2.1 ZrO_2 Radyoopaklaştıcı Ajanı Tane Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Seramik tozlarında partikül aglomeratlarının varlığı, nihai mikroyapıda homojenliği olumsuz etkilemekte ve yapısal kusurların kaynağı olarak görülmektedir [285]. Kurutma, katı malzemelerin eldesiyle sonuçlanan ve sıvı fazdan katıya geçiş sürecini

içeren basit bir işlemdir. Ancak kurutma bir ana faz geçişi içermesi nedeniyle partiküllerin morfolojisinde farklılaşmalara ve hidrodinamik etki, van der Waals kuvvetleri veya Brown hareketleri (parçacıkların birbirlerine çarpması ve tutunması) sonucu karmaşık bir aglomerasyon davranışına neden olabilmektedir [286]. Böylece kurutma basamağının, aglomeratların boyutlarında veya yoğunluğunda belirleyici olduğu düşünülmektedir [287].

Bu durum özellikle de küçük tane boyutlarına sahip seramiklerin sıvı formülasyonlarda, örneğin; polimer-seramik kompozitlerde, depolama sırasında koloidal partiküllerin bir araya gelmesini kolaylaştıran termodinamik kararsızlığın da bir sonucu olarak topaklanma eğilimini arttırmakta ve pratik uygulamalar için önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır [288].

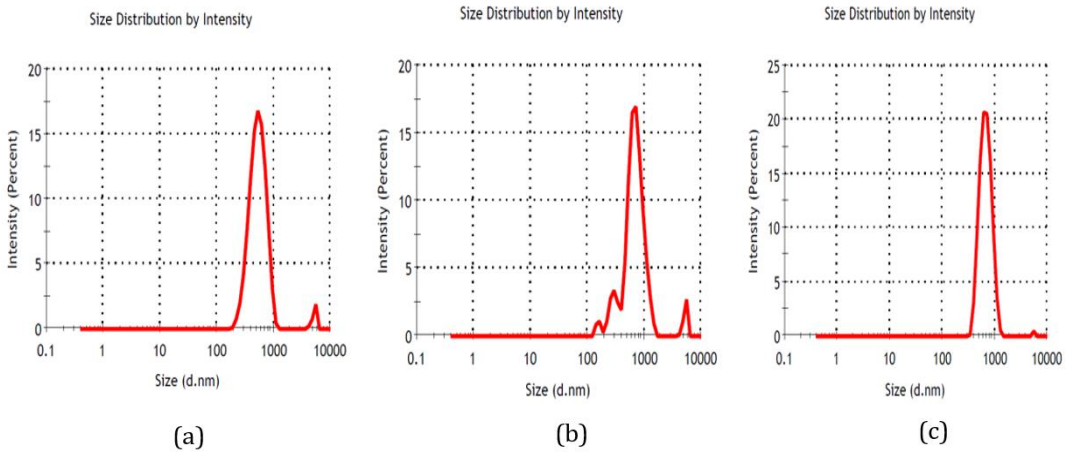
Farklı kurutma yöntemlarının ZrO_2 radyoopaklaştırıcı ajanın morfolojik özellikleri ve aglomerasyon eğilimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla etüv, liyofilizatör ve rotary cihazlarında kurutmaya tabi tutulmuş numunelerin ortalama zeta tane boyutları (d.nm), zeta potansiyel değerleri (mV) ve polidispersite indeksleri (PDI) Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1 Etüv, liyofilizatör ve rotary cihazlarında kurutmaya tabi tutulmuş numunelerin ortalama zeta tane boyutları (d.nm), zeta potansiyel değerleri (mV), efektif çapları (nm) ve polidispersite indeksleri (PDI)

KURUTMA YÖNTEMİ	ORTALAMA ZETA TANE BOYUTU (d.nm)	ZETA POTANSİYEL (mV)	POLİDİSPERSİTE İNDEKSLERİ (PDI)
Rotary Kurutma	871,9	-13,6	0,406
Liyofilizatör	1211	-15,8	0,611
Etüv Kurutma	638,6	-20,4	0,360

Zeta tane boyutu partiküllerin süspansiyon içerisindeki aglomerasyon eğilimi hakkında bilgi vermektedir. Etüv, liyofilizatör ve rotary kurutmaya ait ortalama değerler kıyaslandığında; en düşük ortalama zeta tane boyutunun 638,6 (d.nm) ile

etüv kurutma yöntemi uygulanmış ZrO_2'ye ait olduğu görülmektedir. Bu durum süspansiyon içerisindeki aglomerasyon davranışının diğer yöntemlara kıyasla daha az olduğunu temsil etmektedir. (a) Rotary, (b) liyofilizatör ve (c) etüv cihazları kullanılarak kurutulmuş numunelerin yoğunluğuna göre boyut dağılımları Şekil 5.2'de verilmiştir. Ayrıca, mutlak zeta potansiyel değerleri kıyaslandığında en yüksek stabiliteye sahip numunenin -20,4 mV potansiyel değeriyle etüv kurutma yöntemine ait olduğu belirlenmiştir. Son olarak, farklı yöntemlerle kurutulan tozların PDI indeksleri karşılaştırıldığında ise en homojen partikül boyut dağılımının etüv kurutma sonucu elde edildiği gözlenmiştir.



(a) (b) (c)

Şekil 5.2 (a) Rotary, (b) liyofilizatör ve (c) etüv cihazları kullanılarak kurutulmuş numunelerin yoğunluğuna göre boyut dağılımları

5.2.2 Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi Zeta Potansiyel Ölçümü Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Sunulan tez çalışması kapsamında, ilk aşama olarak optimum jel oranın tayini amacıyla 1 ay boyunca oda koşullarında ve 37°C'de depolanma sonrası %0,1 (J1), %0,3 (J2) ve %0,5 (J3) oranlarında NCC içeren HA jellerin sahip olduğu zeta potansiyel değerleri Tablo 5.2'de verilmektedir.

Tablo 5.2 HA/NCC jellerin zeta potansiyel değerleri

NUMUNE KODU	DEPOLAMA SICAKLIĞI (°C)	ZETA POTANSİYEL (mV)
J1	Oda Koşulları	-40,1
J2	Oda Koşulları	-36,6
J3	Oda Koşulları	-35,8
J1	37 °C	-43,9
J2	37 °C	-42,0
J3	37 °C	-42,6

Tablo 5.2'de belirtildiği gibi en yüksek mutlak zeta potansiyel değeri %0,1 NCC içeren jel ürüne (J1) ait olup, bu yapı en yüksek faz kararlılığına, yani stabiliteye, sahiptir. Bu nedenle enjekte edilebilir greft üretimi çalışmalarına **J1** taşıyıcı jel sistemi kullanılarak devam edilmiştir.

Optimum HA/NCC jelin belirlenmesinin ardından farklı oranlarda β-TCP, ZrO_2 ve CA ilavesi gerçekleştirilmiş ve 8 adet numune arasında faz ayrışması sergilemeyen numuneler zeta potansiyel ölçümüne tabi tutulmuştur. Faz ayrışması sergilemeyen numunelere ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları Tablo 5.3'te verilmektedir.

Tablo 5.3 Faz ayrışması sergilemeyen numunelere ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları

NUMUNE KODU	ZETA POTANSİYEL (mV)	
	Ölçüm 1	**Ölçüm 2**
IBGM 1	-26	-26,7
IBGM 2	-28	-27

Sonuçlar doğrultusunda en yüksek mutlak zeta potansiyel değeri ile en kararlı yapıya sahip numune 50:50 jel/toz oranına sahip sitrik asit ilaveli ürün (IBGM 2) olarak belirlenmiştir. Ek olarak, istenilen faz kararlılığını sağlayan enjekte edilebilir greft materyali SEM, FTIR, ICP-MS, Reometre ve TGA yöntemleriyle de karakterize edilmiş ve hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir.

5.3 X-Işını Kırınımı (XRD) Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Tez çalışmaları kapsamında kimyasal çöktürme yöntemiyle sentezlenen β-TCP ve ZrO_2 'ye ait XRD spektrumları Şekil 5.3'te verilmektedir. Şekil 5.3 (a) R4-1, (b) R3-1, (c) R3-24 β-TCP numunelerin sinterleme işlemi sonrası ve (d) ZrO_2'ye ait XRD spektrumlarını göstermektedir. Numunelerin XRD paternleri, Toz Kırınımı Standartları Ortak Komitesi, Joint Committee on Powder Diffraction and Standards (JCPDS) standart kartları kullanılarak belirlenmiştir.

5.3.1 β-TCP Biyoseramik Tozu XRD Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kimyasal çöktürme yöntemi ile saf β-TCP üretimi, reaksiyon pH'ı, yaşlandırma süresi, sıcaklık ve başlangıç materyallerinin stokiyometrisi gibi birçok etkene bağlı olarak gerçekleşmektedir. Deneysel parametrelerdeki küçük değişiklikler CDHA kalsinasyonu sonrası Ca/P mol oranına bağlı olarak son ürünün bileşiminde farklılıklara neden olabilmektedir [289].

β-TCP sentez parametrelerinin optimizasyonu kapsamında pH 8, 7 ve 5,8 olmak üzere farklı potansiyel hidrojen değerleri ve yaşlandırma süreleri denenmiştir. pH değerindeki düşüşün OH^- iyonlarının konsantrasyonunu azaltarak HAp oluşturmak için gereken stokiyometrinin β-TCP oluşumu lehine değişmesini ve artan yaşlanma sürelerinin ise reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli zamanı sağlaması beklenmektedir. Yapılan çalışmalar reaksiyon pH'ı ile tozların Ca/P molar oranı arasında güçlü bir ilişki olduğunu ve azalan pH değerlerinde kalsiyum pirofosfat ($Ca_2P_2O_7$) piklerinin oluştuğunu göstermektedir [269].

Ayrıca, artan pH değerleri için gerekli amonyak ilavesi de β-TCP'nin saflığını etkilemektedir. Önceki çalışmalarda alkali ortamlarda β-TCP'nin HAp'ye dönüştüğü gözlenmektedir [290]. Bu durum, β-TCP sentez optimizasyonu kapsamında R1 ile elde edilen pH 7 (iki aşamalı pH kontrolü nedeniyle ek amonyak ilavesi içeren) ve R2 ile pH 8 koşulunda sentezlenmiş numunelerde yaşanan öğütme işlemi zorluğunu açıklamaktadır. Bu nedenle karakterizasyon çalışmalarına R3 ve R4 ile devam edilmiştir.

Toz numunelere ait pikler standart β-TCP kırınım modeliyle (JCPDS No: 09-0169) kıyaslanmıştır [291], [292], [293], [294] [295]. Şekil (b) ve (c)'de sunulan R3-1 ve R3-24 numuneleri XRD sonuçları incelendiğinde tüm örneklerde β fazının kristalliğini temsil eden en yüksek pik sırasıyla (210) düzlemine karşılık gelen $2\theta = 31{,}28^{o}$ ve $2\theta = 31{,}24^{o}$ değerlerinde bulunmaktadır. Diğer ortalama β-TCP fazı karakteristik pikleri ise R3-1 numunesi için; $2\theta = 26{,}76^{o}$ (1010 düzlemi), $2\theta = 27{,}79^{o}$ (214 düzlemi) ve $2\theta = 34{,}66^{o}$ (220 düzlemi) ve R3-24 numunesi için $2\theta = 27{,}97^{o}$ (1010 düzlemi), $2\theta = 29{,}78^{o}$ (214 düzlemi) ve $2\theta = 34{,}54^{o}$ (220 düzlemi) değerlerinde bulunmaktadır.

Şekil 5.3 (a)'da gösterilen R4-1 numunesinde ise en yüksek pik $2\theta = 29{,}77^{o}$ (008 düzlemi) değerinde bulunmaktadır. Diğer pikler ise $2\theta = 27{,}79^{o}$ (202 düzlemi), $2\theta = 29{,}06^{o}$ (203 düzlemi) ve $2\theta = 32{,}70^{o}$ (205 düzlemi) değerlerinde görülmektedir. Elde edilen veriler JCPDS No: 09-0346 ile uyumlu olarak yapının β-$Ca_2P_2O_7$ fazına ait olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte bazı piklerin genişlemesi, tozun bir kısmının hala amorf durumda veya kristal yapıda olmasına karşılık düşük kristalit boyutlarında olduğunu göstermektedir.

5.3.2 ZrO_2 Radyoopaklaştıcı Ajanı XRD Sonuçları ve Değerlendirilmesi

ZrO_2'nin sıcaklığa bağlı olarak üç polimorfu bulunmaktadır. Bu formlar, 1170°C'den düşük sıcaklıklarda elde edilen monoklinik ZrO_2 (m-ZrO_2), 1170 ile 2370°C arasında bulunan tetragonal ZrO_2 (t-ZrO_2) ve 2370°C'den yüksek sıcaklıklardaki faz geçişi ile meydana gelen kübik ZrO_2 olarak bilinmektedir (k-ZrO_2) [296], [297], [298].

Şekil 5.3 (d)'de sunulan XRD deseni incelendiğinde, belirtilen düzlemlere karşılık gelen değerlerin, $2\theta = 28{,}16^{o}$ (-111 düzlemi), $2\theta = 31{,}44^{o}$ (111 düzlemi) ve $2\theta = 38{,}5^{o}$ (120 düzlemi) $2\theta = 50{,}17^{o}$ (022 düzlemi) ve $2\theta = 59{,}8^{o}$ (131 düzlemi) değerlerinin, standart monoklinik ZrO_2 kırınım modeliyle (JCPDS: 37-1484) uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Hacimce monoklinik faz oranı, kırınım modelindeki yansımaların yoğunlukları arasındaki ilişkiye bağlı olarak Eşitlik (5.1), (5.2), (5.3) ve (5.4) kullanılarak hesaplanmıştır [299].

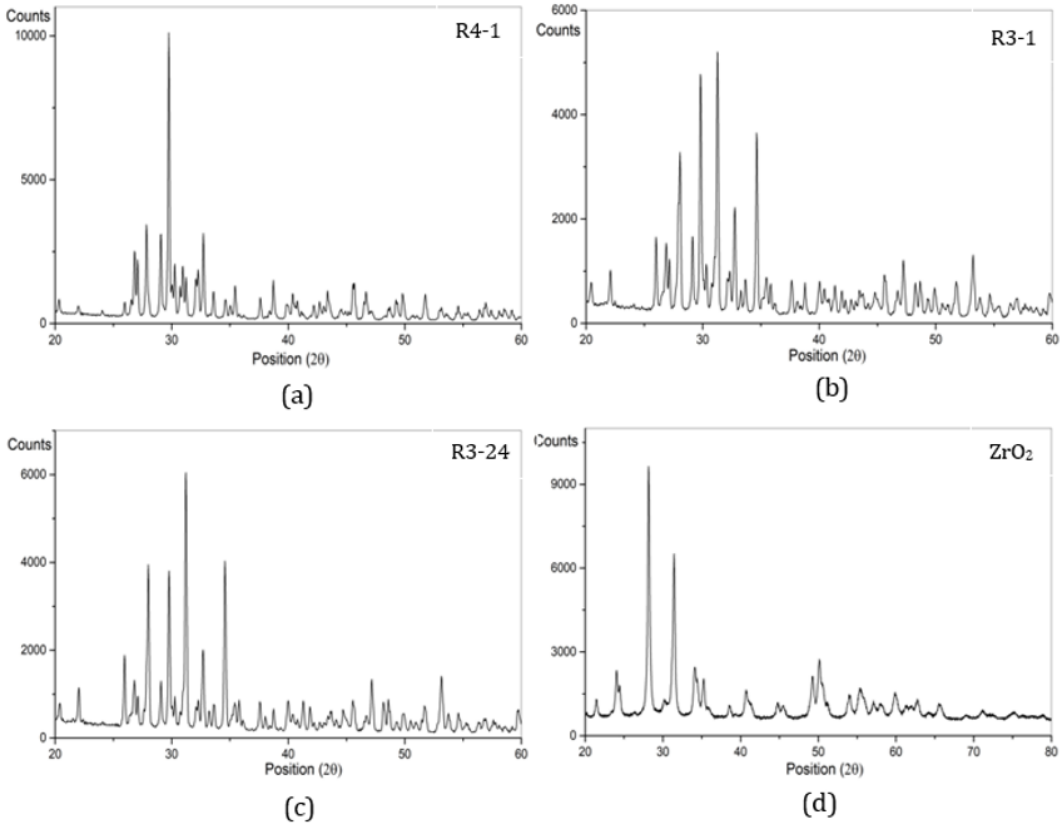
$$\mathrm{Im}(111) + \mathrm{Im}(-111) = \mathrm{It}(101) \quad (5.1)$$

$$\mathrm{Xm} = \frac{\mathrm{Im}(111)+\mathrm{Im}(-111)}{\mathrm{Im}(111)+\mathrm{Im}(-111)+\mathrm{It}(101)} \quad (5.2)$$

$$\mathrm{Vm} = \frac{1{,}311\mathrm{Xm}}{1+0{,}311\mathrm{Xm}} \quad (5.3)$$

$$\mathrm{Vt} = 1 - \mathrm{Vm} \quad (5.4)$$

Verilen eşitliklerde; X_m: monoklinik faz yoğunluk oranını, V_m: monoklinik faz hacim oranını, V_t: tetragonal faz hacim oranını, I_m (111) 31,5° 2θ değerindeki monoklinik tepe noktası şiddetini, I_m (-111) 28,5° 2θ değerindeki monoklinik tepe noktası şiddetini ve I_t (101) 30,2° 2θ değerindeki tetragonal tepe noktası şiddetini temsil etmektedir. Analiz sonucu elde edilen XRD verileri ilgili eşitlikler kullanılarak hesaplandığında %96 oranında monoklinik faz varlığı ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, sentezlenen ZrO_2 tozunun, %89,8 kristalin ve %10,2 amorf fazdan oluştuğu tespit edilmiştir.



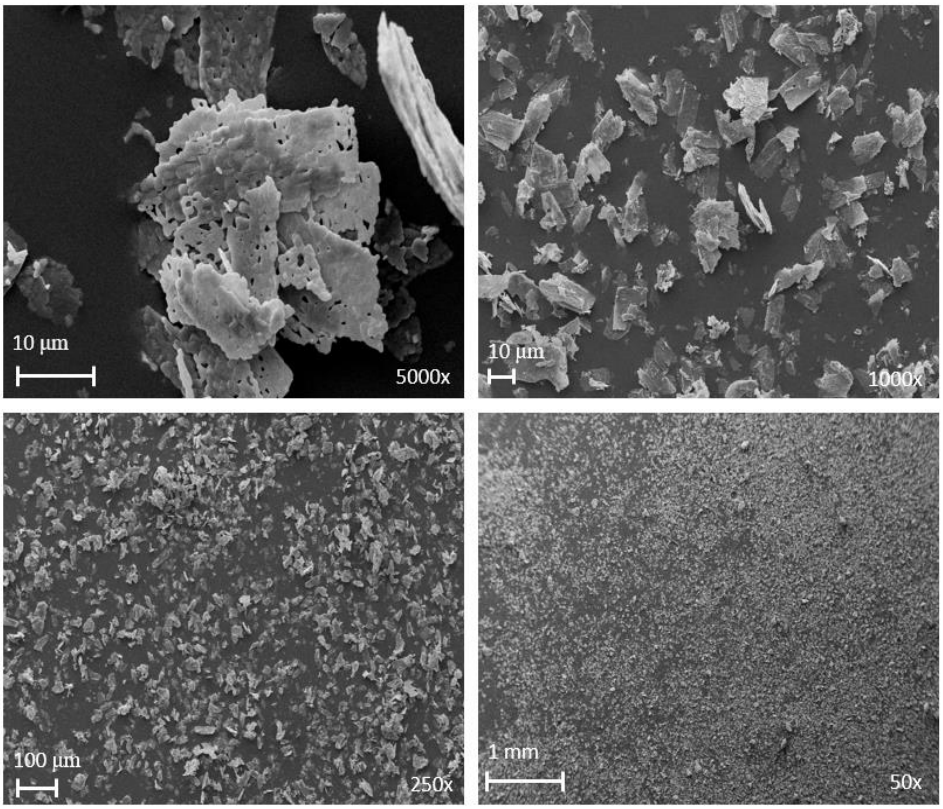
Şekil 5.3 (a) R4-1, (b) R3-1, (c) R3-24 β-TCP numunelerin sinterleme işlemi sonrasına ve (d) ZrO_2'ye ait XRD spektrumları

5.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-EDS) Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Biyoaktif faz olarak kullanılan β-TCP'nin, radyoopaklaştırıcı ajan olarak yapıya ilave edilen ZrO_2'nin ve geliştirilen optimum HA/NCC oranlarına sahip enjekte edilebilir greftin SEM görüntüleri; bileşenlerin faz dağılımlarının ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla değerlendirilmiştir. Ayrıca, bileşimdeki elementlerin kalitatif ve kantitatif tayini amacıyla, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS) analizi gerçekleştirilmiştir.

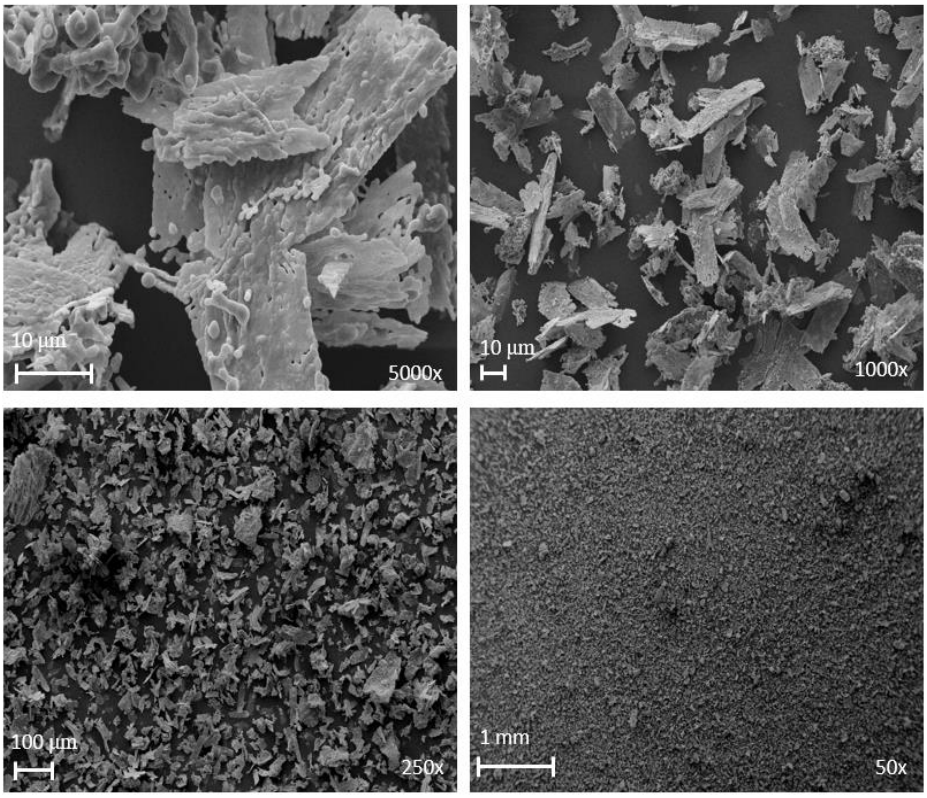
5.4.1 β-TCP Biyoseramik Tozu SEM-EDS Sonuçları ve Değerlendirilmesi

50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerde gerçekleştirilen taramalı elektron mikroskobisi incelemelerine ait görüntüler Şekil 5.4 (R4-1), Şekil 5.5 (R3-1) ve Şekil 5.6'da (R3-24) verilmektedir.



Şekil 5.4 R4-1 numunesine ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Saf β-TCP sentezi; reaksiyon pH'ı, sıcaklık, başlangıç malzemelerinin stokiyometrisi ve yaşlanma süreleri gibi birçok deneysel parametrenin kontrolünde gerçekleşmektedir. Bu parametrelerdeki ufak değişimler nihai ürünün bileşiminde ciddi farklılıklara yol açabilmektedir. SEM görüntüleri kıyaslandığında farklı pH aralıklarında sentezlenmiş β-TCP biyoseramiklerine ait morfolojilerin pH değişiminden ve yaşlanma sürelerinden önemli ölçüde etkilendiği gözlenmektedir [289]. Yapılan çalışmalarda; kurutulmuş CDHA partiküllerinin, kimyasal çöktürme yöntemi ile sentezlenmiş stokiyometrik veya stokiyometrik olmayan HAp'ye benzer olarak, iğne benzeri ve dikdörtgen plakalardan oluşan bir morfoloji sergilediği gözlenmektedir [279, 300]. Ayrıca literatürde pH 6 civarında elde edilen çökeltilerin sinterlenmesi sonucu β-$Ca_2P_2O_7$ ve β-TCP fazları elde edildiği bilinmektedir. R4-1 numunesine ait SEM görüntülerinde yapıda belirgin ince plakaların varlığı tespit edilmiştir. Bu durum CDHA'dan β-TCP'ye dönüşüm reaksiyonunun tam olarak gerçekleşmediğini göstermektedir.

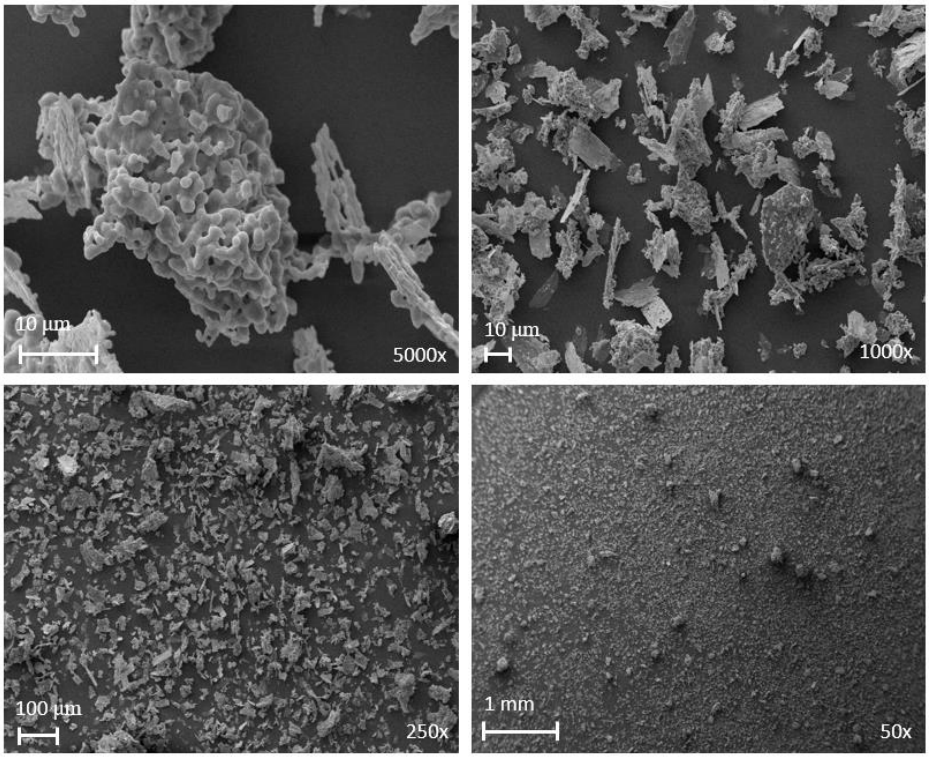


Şekil 5.5 R3-1 numunesine ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri

pH değeri yükseldiğinde ise R3-1 ve R3-24 numunelerinde görüldüğü üzere eş eksenli tane oluşumu eğilimi söz konusudur. Kalsiyum fosfatların doğası gereği tek aşamada TCP oluşumu gerçekleşememektedir. Bu nedenle kimyasal çöktürme işleminde öncelikli olarak Ca/P mol oranı 1,5 olan ve apatit TCP [$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH$] adı verilen ürünün çöktürülmesi ve ardından sinterleme (kalsinasyon) işlemi yoluyla yüksek sıcaklıkta β-TCP'ye dönüştürülmesi işlemleri gerçekleştirilmektedir. Apatitin 1 molünden 3 mol trikalsiyumun ve 1 mol H_2O'nun yapıdan ayrılması Reaksiyon (5.1) gösterilmektedir.

$$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH) = Ca_9(PO_4)_6H_2O = 3Ca_3(PO_4)_2 + H_2O \qquad (5.1)$$

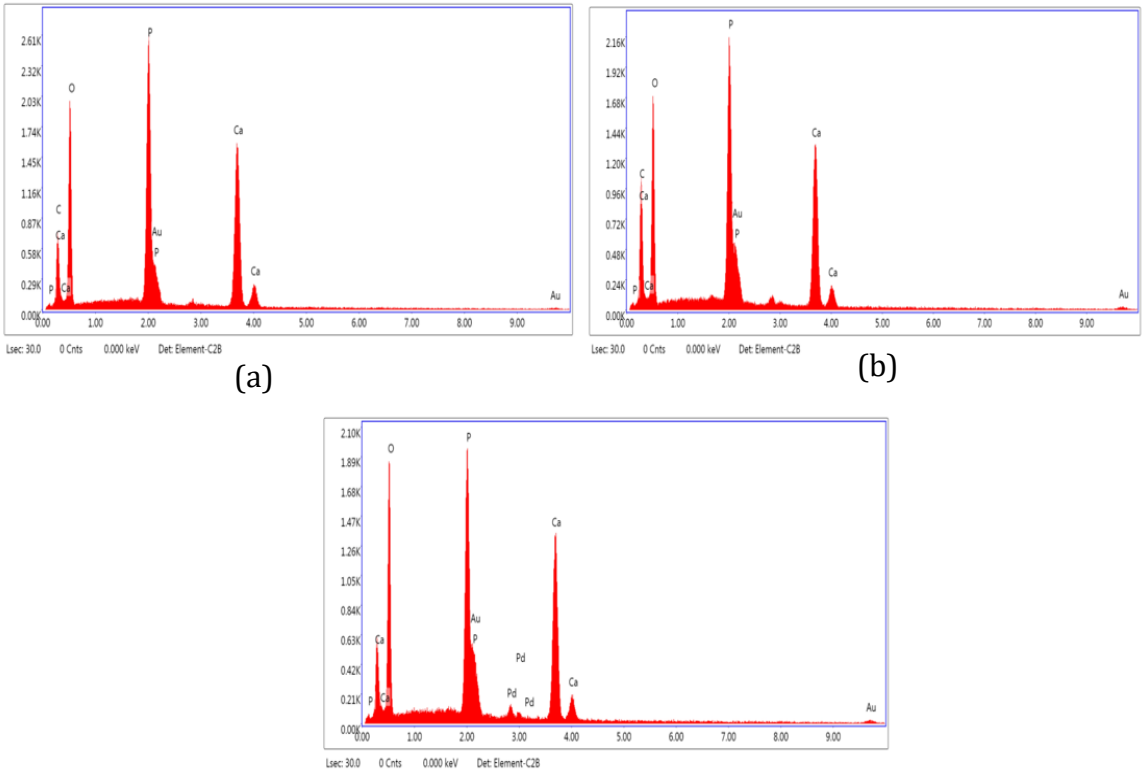
Bu reaksiyon, ilk çökeltinin kristal yapısında ufak bir değişiklik içermektedir. Bu nedenle, reaksiyonun tamamlanması için yeterli süreye (yaşlanma işlemine) ihtiyaç duyulmaktadır [301]. R3-1 ve R3-24 numuneleri kıyaslandığında artan yaşlanma süreleri ile küresel morfolojiye sahip partiküllerin oluştuğu ve bu partiküllerin aglomerasyon davranışının daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 5.6 R3-24 numunesine ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Şekil 5.7'de ise β-TCP (a) R4-1, (b) R3-1 ve (c) R3-24 numunelerine ait EDS spektrumları verilmiştir. Şekil 5.7'de görüldüğü üzere ana X-ışını pikleri Ca, P, O, C ve Au elementlerine aittir. Yapıda sırasıyla ağırlıkça %6,2, %8,7 ve %9,8 olarak tespit edilen Au ve R3-24 numunesinde gözlenen %2,5 Pd, taramalı elektron mikroskobisi öncesi gerçekleştirilen altın-paladyum iletken metal kaplamanın bir sonucudur. Ayrıca R4-1 numunesinde ağırlıkça %4,5 ve R3-1 numunesinde ağırlıkça %9,9 oranında belirlenen C'nin ise, numunelerin tutturucuya yerleştirilmesinde kullanılan karbon bantlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı koşullarda sentezlenen β-TCP numunelerine ait Ca/P mol oranları Tablo 5.4'te verilmiştir. EDS sonuçları tüm kalsine β-TCP biyoseramik tozlarının benzer kimyasal bileşimlere sahip olduğunu ve artan pH ve yaşlandırma süreleri ile Ca/P mol oranının arttığını göstermektedir.



(a) (b)

(c)

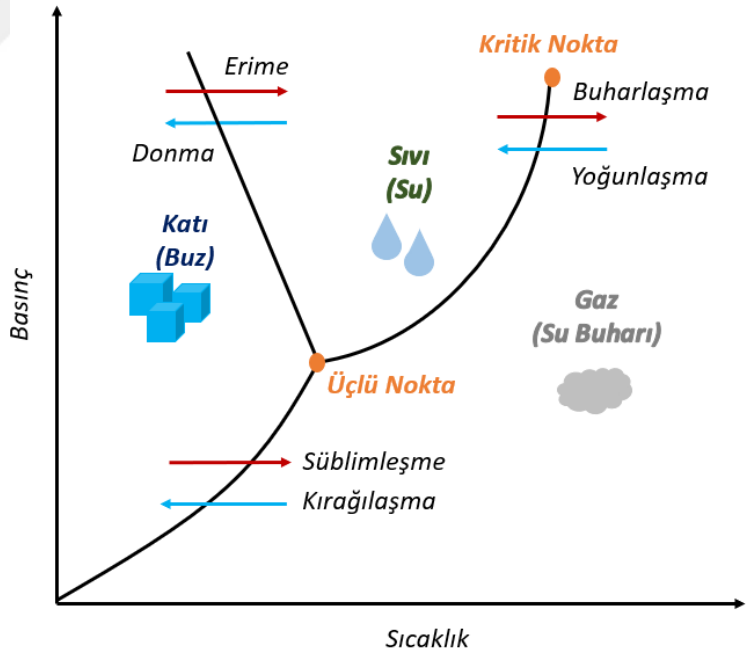
Şekil 5.7 (a) R4-1, (b) R3-1, (c) R3-24 β-TCP numunelerine ait EDS spektrumları

Tablo 5.4 Farklı koşullarda sentezlenen β-TCP numunelerine ait Ca/P mol oranları

NUMUNE KODU	Ca (%, AĞIRLIK)	P (%, AĞIRLIK)	Ca/P (MOL ORANI)
R4-1	32,9	22,1	1,488
R3-1	29,9	19,6	1,525
R3-24	31,8	20,0	1,590

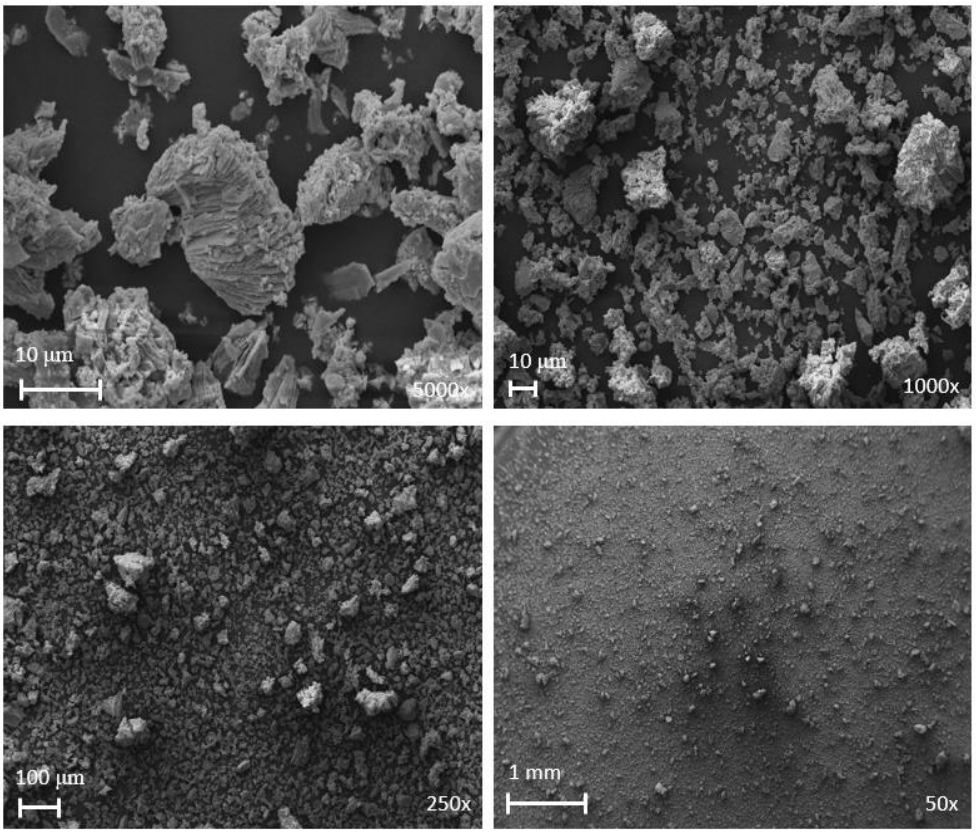
5.4.2 ZrO_2 Radyoopaklaştıcı Ajanı SEM-EDS Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Farklı kurutma yöntemleri kullanılarak üretilmiş ZrO_2 radyoopaklaştıcı ajanlarına ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerde gerçekleştirilen taramalı elektron mikroskobisi görüntüleri Şekil 5.9 (Liyofilizasyon), Şekil 5.11 (Rotary kurutma) ve Şekil 5.12'de (Etüv kurutma) sunulmaktadır. Tez çalışması kapsamında sentezlenen ZrO_2 tozlarına ait SEM görüntüleri, numunelerin küçük parçacıklar ve bunların biraraya gelmesi sonucu oluşan heterojen dağılımlı ve daha büyük boyutlara sahip yapılardan meydana geldiğini göstermektedir.



Şekil 5.8 Suya ait basınç-sıcaklık faz diyagramı

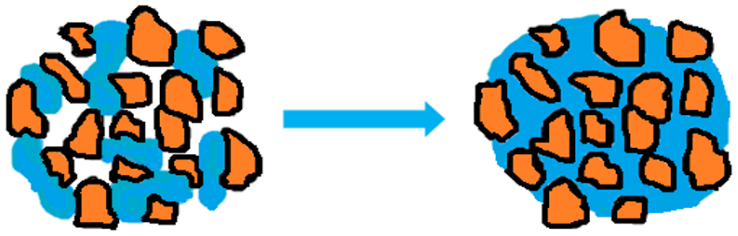
Genel olarak tanelerin sahip oldukları morfolojinin tozun nihai özelliklerini etkilediği ve böylece, sinterlenmiş tozun kullanımında ve işlenmesinde belirleyici olduğu bilinmektedir. Üretim basamakları arasında, kontrol edilebilir boyut dağılımları ve morfolojilerin eldesinde kritik aşamalardan biri de, sıvı fazdan katıya geçiş sürecini içeren "kurutma" işlemidir. Bu nedenle çeşitli kurutma yöntemlerinin morfoloji üzerine etkilerinin incelenmesi büyük önem taşımaktadır [302]. Termodinamik bakış açısıyla, basınca ve sıcaklığa bağlı olarak bir madde katı, sıvı ve gaz olarak tanımlanan üç fazda bulunabilmektedir. Suya ait basınç-sıcaklık faz diyagramı Şekil 5.8'de sunulmaktadır. Üçlü noktanın altındaki sıcaklık ve basınç koşullarında düşük basınç çözündürme için yeterli enerjiyi sağlasa bile, sıvı oluşumu için yetersiz olacağından belirtilen şartlarda süblimleşerek gaz faza geçiş meydana gelmektedir.



Şekil 5.9 Liyofilizatör kurutma uygulanmış ZrO_2'ye ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Bu nedenle örneğin, liyofilizatör veya rotary kurutma gibi yöntemlerde kontrollü vakum uygulanarak kaynama noktasını düşürmek ve daha düşük sıcaklıklarda buharlaşmayı sağlamak hedeflenmektedir [303]. Liyofilizasyon işlemi dondurma ve kurutma adımlarını içeren iki basamaklı bir süreçtir. Dondurma aşaması, çözünen maddeyi camsı ve/veya kristal fazda bırakarak yapıda bulunan suyun buza dönüştürülmesini içermektedir. Kurutma ise donmuş suyu süblimleştirme yoluyla ve donmamış "bağlı" suyu desorpsiyonla uzaklaştırma işlemidir [304]. Başka bir deyişle liyofilizasyon, malzemeyi dondurma ve ardından ortam basıncını düşürerek ve numunedeki donmuş suyun doğrudan katı fazdan gaz fazına süblimleşmesini destekleyecek gerekli ısıyı sağlayarak gerçekleştirilen kurutma işlemi olarak da tanımlanmaktadır [305]. Ancak bu yöntemin yüksek maliyet ve enerji gereksinimi kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca, özellikle de yüksek miktarlarda numunenin tamamen kurutulması için gerekli işlem süresinin uzun olması (>20 saat) da bu işlemin bir başka dezavantajıdır [306].

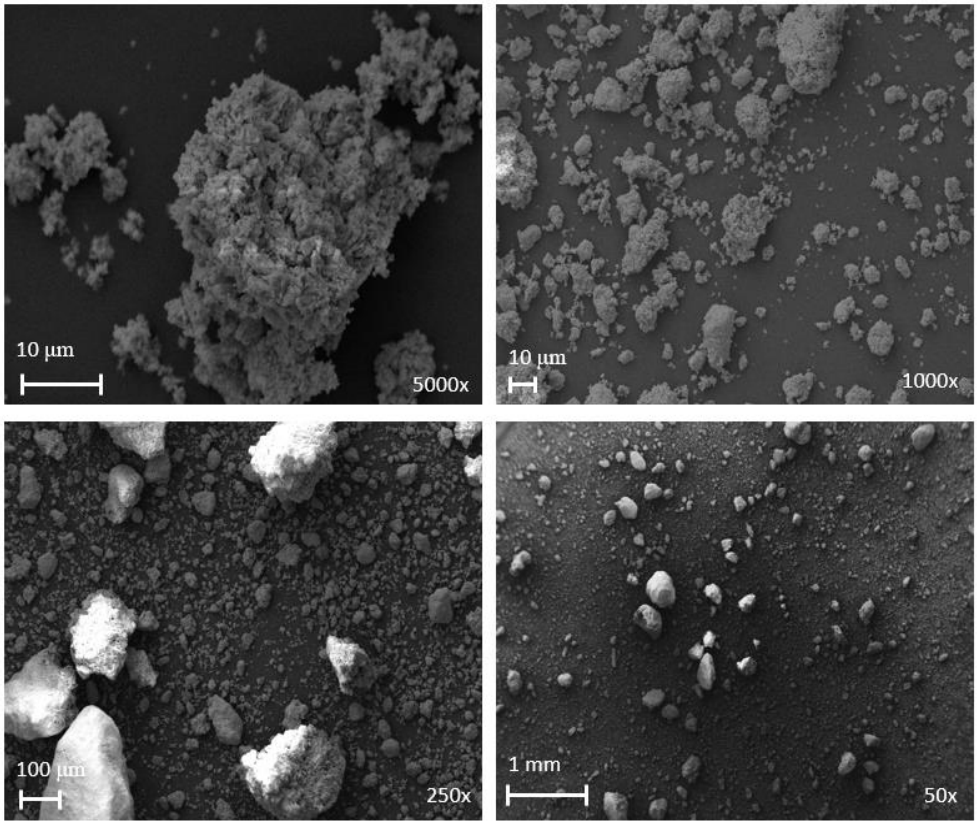
-70 ^{o}C ve 0.5-0.8 mbar aralığında vakum koşullarında liyofilizatör ile kurutma işlemine tabi tutulan ZrO_2 toz numunelerine ait SEM görüntüleri incelendiğinde aglomere olmuş düzensiz şekilli ve plaka benzeri yapıların varlığı görülmektedir. Materyal yapısındaki suyun varlığının seramik ile nispeten büyük van der Waals çekim kuvvetleri oluşturması nedeniyle partiküllerin aglomerasyonunun oluştuğu bilinmektedir [307]. Basitçe yapıda nemin mevcut olması halinde partiküller arasında sıvı köprüler oluşmakta ve bu durum topaklanmaya neden olmaktadır [308]. Yapıdaki neme bağlı olarak köprü oluşumu (a) ve topaklanmaya (b) ait temsili görüntü Şekil 5.10'da verilmektedir.



(a) (b)

Şekil 5.10 Yapıdaki neme bağlı olarak köprü oluşumu (a) ve topaklanma (b)

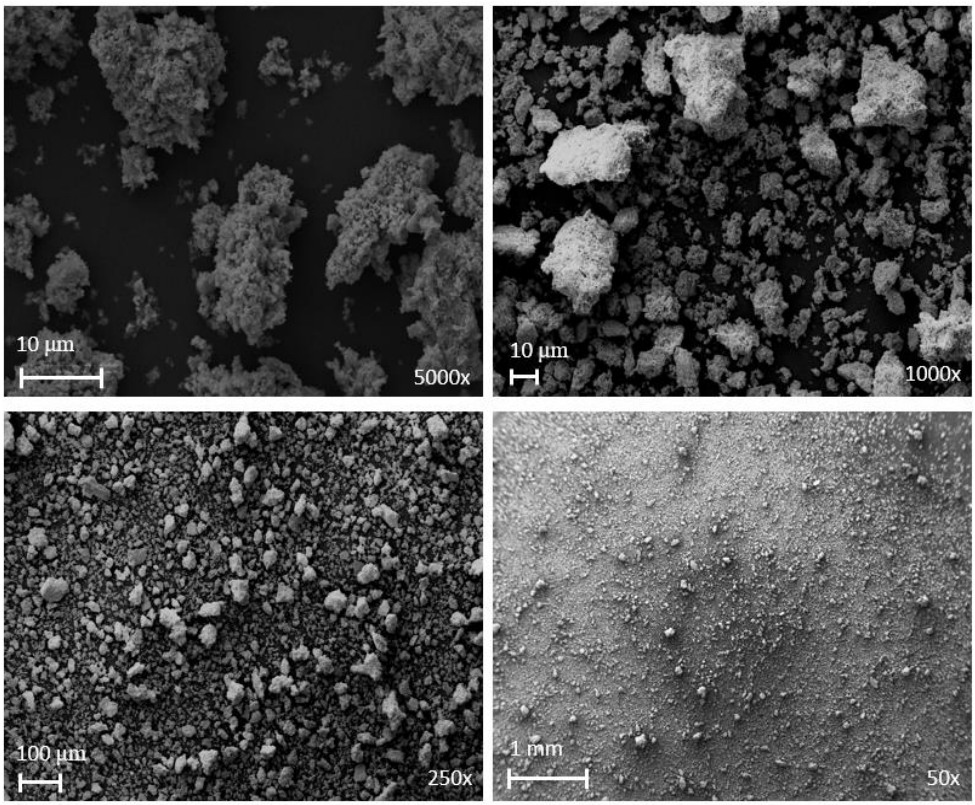
Bu nedenle liyofilizasyon uygulanmış numunelere ait SEM görüntülerinde (Şekil 5.9) gözlenen yüksek topaklanma eğiliminin kurutmanın tamamen gerçekleşmemesi sonucu yapıda bir miktar suyun kalmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5.11 Rotary kurutma uygulanmış ZrO_2'ye ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Çeşitli çözücülerin sıvılardan veya katılardan ayrıştırılmasını sağlayan yöntemlerden biri de rotary evaporasyon işlemidir. Bu işlemde ilk adım bir vakum pompası yardımıyla ortam basıncını düşürmek ve böylece çözücünün kaynama noktasında da düşüşe neden olmaktır. Ardından numune yüksek hızda döndürülmekte, bu sayede numunenin yüzey alanı arttırılmakta ve çözücünün buharlaşma süreci kolaylaştırılmaktadır. Ayrıca, nispeten daha düşük sıcaklıkların uygulanmasıyla buharlaşma süreci hızlandırılmaktadır. Böylece rotary kurutma işlemi ile çözücü, numuneden uzaklaştırılmaktadır. Ancak, özellikle de döndürme hareketine bağlı olarak yüksek titreşimlerin meydana gelmesi ve partiküllerin

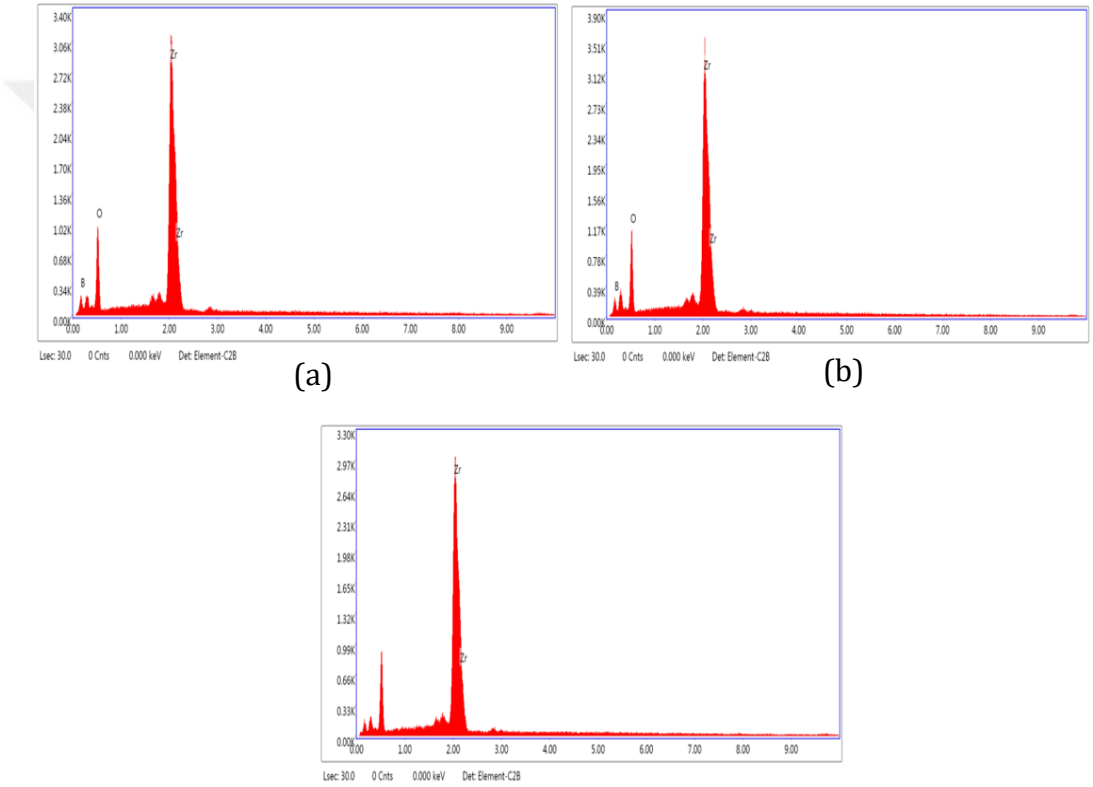
rastgele saçılması sonucu oluşan çarpışmaların aglomerasyona neden olması, bu yöntemin önemli dezavantajarındandır [309]. Rotary kurutma işlemine tabi tutulmuş ZrO_2 toz numunede, yüksek aglomerasyon eğilimine sahip daha küresel yapıların varlığı görülmektedir. Bu durumun, rotasyon hareketine bağlı olarak partiküllerin çarpışmasının ve böylece, biraraya gelmelerinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5.12 Etüv kurutma uygulanmış ZrO_2'ye numunesine ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Kurutma amacıyla kullanılan ve geleneksel yöntem olarak da bilinen bir diğer metot ise etüv kurutmadır. Bu yöntemin sıklıkla tercih edilmesindeki en önemli neden uygulamanın pratikliği ve yüksek hacimli numunelerde kolaylıkla suyun uzaklaşmasını sağlamasıdır. Geleneksel etüv kurutmada uygulanan ısı yüzeyden malzemenin içerisine doğru aktarılmaktadır. Böylece buharlaşmanın meydana gelmesiyle malzeme yüzeyi ile iç kısmı arasında basınç farkı oluşmakta ve içerideki nem dışarı atılmaktadır. Etüv kurutmada göz önüne alınması gereken önemli bir nokta, ürün tamamen kuruduktan sonra yanma meydana gelme riskidir. Bu nedenle

kurutma işlemi kontrollü olarak gerçekleştirilmelidir [310]. Etüv kullanılarak üretilen ZrO_2 toz numunelerine ait SEM görüntüleri incelendiğinde, küresel morfolojiye sahip ve diğer numunelere kıyasla daha düşük topaklanma eğilimi sergileyen bir yapı elde edildiği gözlenmektedir. Belirtilen sonuçlar "tane boyutu ve zeta potansiyel" ölçümleri ile uyumlu olarak liyofilizatör ve rotary kurutma işlemleri ile elde edilen ZrO_2 numunelerin, etüv kurutmaya kıyasla daha büyük partikül boyutlarına ve yüksek aglomerasyon eğilimine sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, etüv kurutma ile suyun uzaklaştırılması işleminin daha yüksek verimle sonuçlandığını kanıtlamaktadır.



Şekil 5.13 (a) Liyofilizatör, (b) rotary ve (c) etüv kurutma uygulanan ZrO_2 numunelerine ait EDS spektrumları

Şekil 5.13'te liyofilizasyon (a), rotary kurutma (b) ve etüv kurutma (c) uygulanan ZrO_2 numunelerine ait EDS spektrumları verilmiştir. Şekil 5.13'de görüldüğü üzere ana X-ışını zirveleri Zr, O ve B elementlerine aittir.

Farklı kurutma yöntemlerine ait ağırlıkça element yüzdeleri (%) Tablo 5.5'te sunulmuştur.

Tablo 5.5 Farklı kurutma yöntemlerine ait ağırlıkça element yüzdeleri (%)

KURUTMA YÖNTEMİ	Zr (%, AĞIRLIK)	O (%, AĞIRLIK)	B (%, AĞIRLIK)
Liyofilizatör	72,0	24,7	3,3
Rotary Kurutma	72,4	24,4	3,2
Etüv Kurutma	100,0	-	-

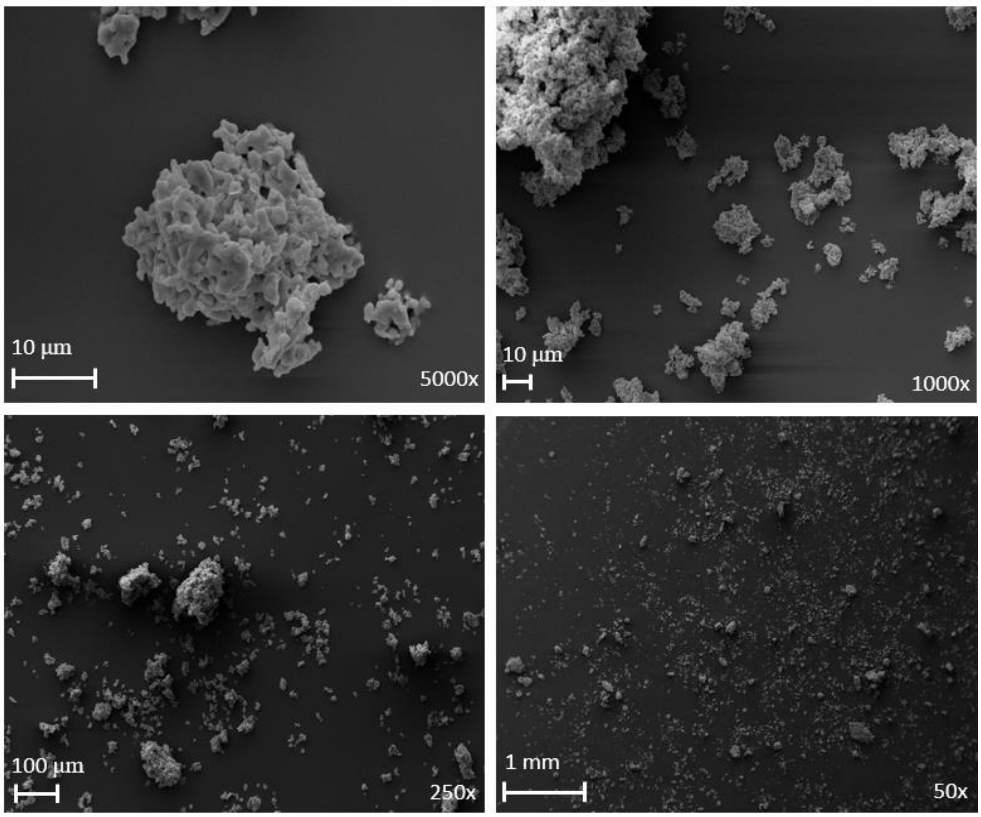
Elementel haritalama sonuçları, XRD analizi sonuçları ile de uyumlu olarak sentezlenen yapının yüksek safiyette ZrO_2 olduğunu desteklemektedir.

Döner kurutma işleminde dikkat edilmesi gereken hususlardan biri de rotary balonu olarak adlandırılan cam malzemenin temizliğine dikkat edilmesidir. Bu durum numunenin saflığını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Benzer durum liyofilizasyon işleminde kullanılan cam balon için de geçerlidir. Ayrıca, numunenin havaya maruz kalması da numunenin kontaminasyonuna neden olabilmekte ve böylece, safsızlıklıklar oluşabilmektedir. Bu nedenle, rotary ve liyofilizatör kurutma işlemlerinden elde edilen numunelerin elementel analiz sonucunda sırasıyla ağırlıkça %3,2 ve %3,3 olarak belirlenen Bor (B) elementinin kurutma işlemlerinde kullanılan ekipmandan kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.4.3 Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi SEM-EDS Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Deneysel çalışmalar kapsamında geliştirilen 50:50 jel/toz oranına sahip CA ilaveli enjekte edilebilir grefte (IBGM 2) ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 5.14'de verilmiştir. Hiyalüronik asit, sahip olduğu yüksek negatif yükler ve hidrofiliklik özelliği sayesinde katı hacminin 1000 katına kadar su tutabilme kapasitesine sahip bir polimerdir [311]. Literatürde verilen bilgilerle uyumlu olarak, karakterizasyon çalışmaları kapsamında yaş numuneye uygulanan TGA analizinde de yapının %43'ünün sudan meydana geldiği tespit edilmiştir. Görüntülemenin gerçekleştirilebilmesi amacıyla SEM-EDS analiz protokolünde belirtildiği şekilde numuneler kurutulmuştur. Bu nedenle IBGM'ye ait SEM

görüntülerinde ağırlıklı olarak biyoaktif faza (β-TCP) ait kümeler ve küresel morfolojiye sahip parçacıklar görülmektedir.

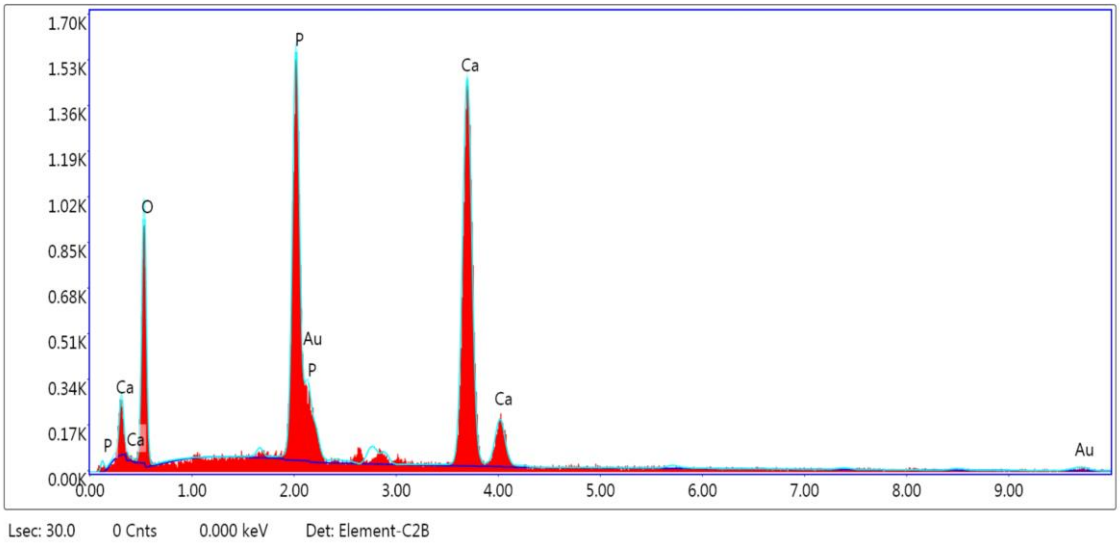


Şekil 5.14 IBGM 2'ye ait 50x, 250x, 1000x ve 5000x büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Geliştirilen optimum özelliklere sahip IBGM 2'ye ait EDS spektrumları Şekil 5.15'te verilmektedir. Görüldüğü üzere ana X-ışını pikleri Ca, P, O ve Au elementlerine aittir. Elementel haritalama sonucu enjekte edilebilir yapıda ağırlıkça % 44,7 Ca, %28,3 O, %19,8 P ve %7,2 Au tespit edilmiştir.

Kurutulmuş IBGM'ye ait kesitten elde edilen veriler, geliştirilen üründe 50:50 oranında bulunan β-TCP'ye aittir. Düşük miktarda tespit edilen Au ise numune hazırlama sürecinde uygulanan altın-paladyum iletken metal kaplamadan kaynaklanmaktadır.

Yapıda bulunan NCC, CA ve ZrO_2'nin düşük miktarlarda kullanılması nedeniyle EDS analizinde ilgili elementlerin varlıkları tespit edilememiştir.



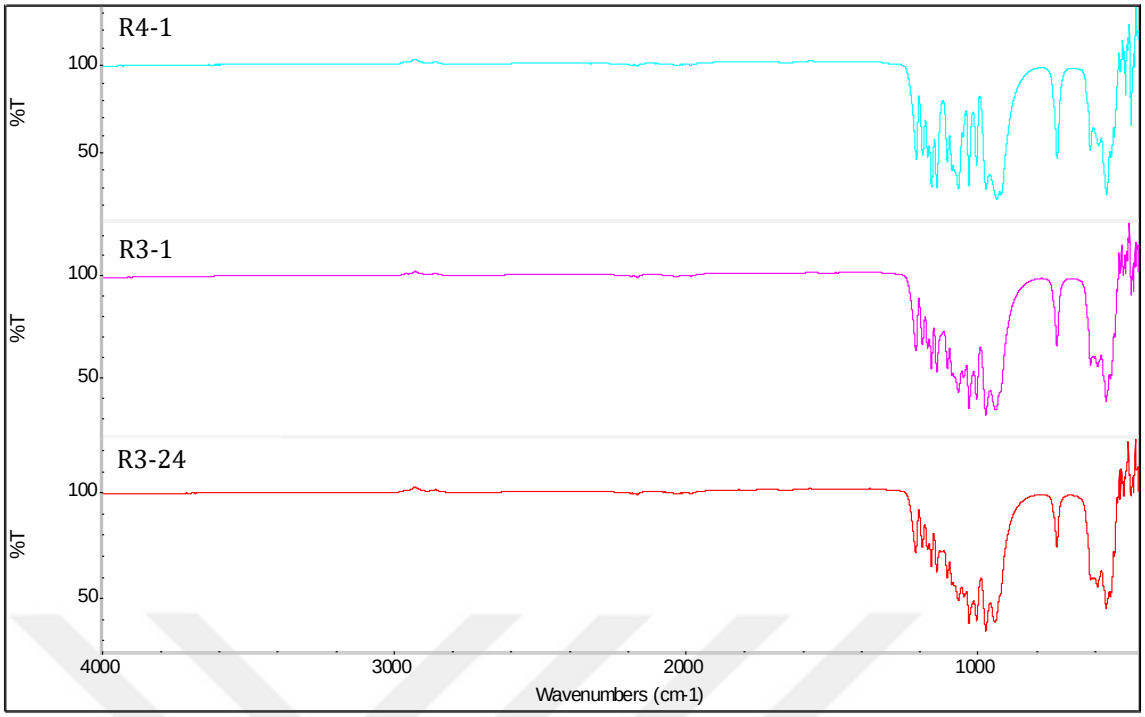
Şekil 5.15 Geliştirilen optimum özelliklere sahip IBGM 2'ye ait EDS spektrumları

5.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Enjekte edilebilir greftlerin sahip oldukları farklı kimyasal gruplara ait absorbans pikleri FTIR analizi belirlenmiş olup, mevcut literatürdeki fonksiyonel grupların spesifik dalga boylarındaki karakteristik absorbans pikleri ile kıyaslanmıştır.

5.5.1 β-TCP Biyoseramik Tozu FTIR Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Optimizasyon çalışmaları kapsamında farklı pH ve yaşlandırma koşullarında sentezlenen β-TCP biyoseramiklerine ait FTIR spektrumları Şekil 5.16'da verilmektedir.



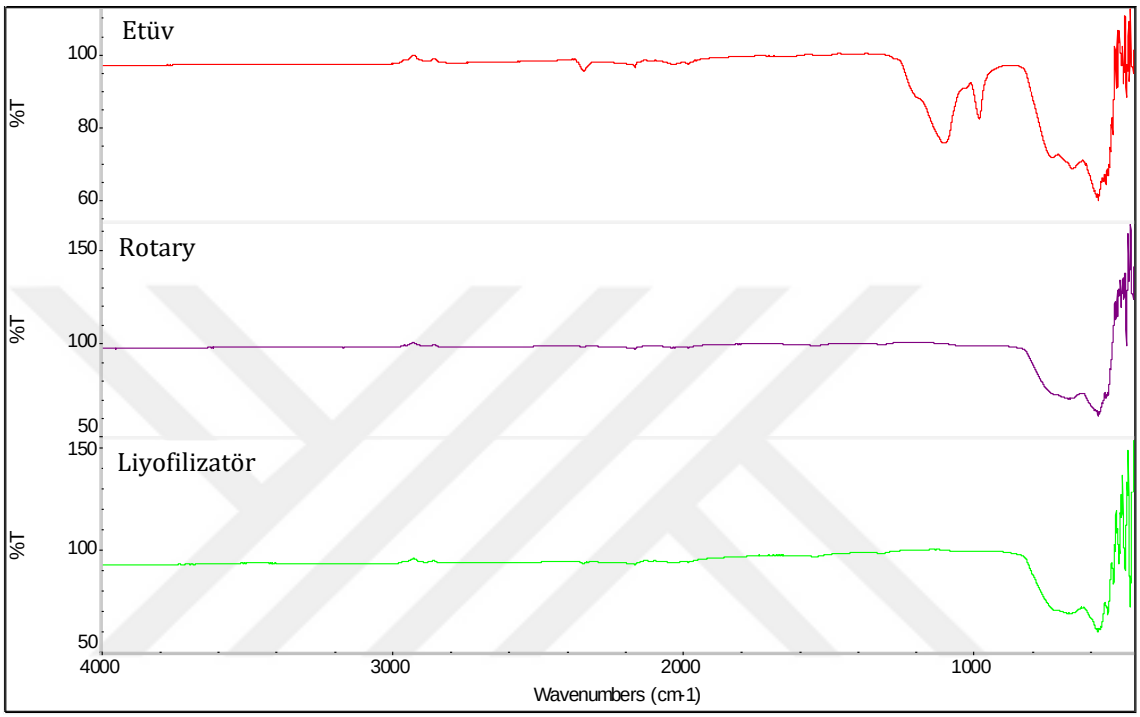
Şekil 5.16 Farklı koşullarda sentezlenen β-TCP biyoseramiklerine ait FTIR spektrumları

Literatürdeki çalışmalarda, 1040-1080 cm^{-1} aralığındaki bantların, PO_4^{3-}'nin v3 asimetrik gerilme titreşimini, 960-970 cm^{-1}'deki bantların PO_4^{3-} v1 simetrik gerilme titreşimini, ve 550-610 cm^{-1}'deki bantların ise v4 asimetrik gerilme modunu temsil ettiği bilinmektedir [275], [294], [312], [313], [314]. FTIR spekturumlarına göre; R4-1 numunesine ait 471,51 (v2), 556,36 (v4), 968,92 (v1) ve 1062,78 (v3) cm^{-1}, R3-1 numunesine ait 471,43 (v2), 556,61 (v4), 969,05 (v1) ve 1062,94 (v3) cm^{-1} ve R3-24 numunesine ait 471,80 (v2), 556,65 (v4), 969,14 (v1) ve 1062,77 (v3) cm^{-1} dalga boylarındaki piklerin trikalsiyum fosfatların karakteristik fosfat gerilme ve titreşim spektrumlarına ait olduğu görülmektedir. Ayrıca, sırasıyla 1650,65, 1651,47 ve 1651,43 cm^{-1} piklerin ise, yapıda absorbe edilen suya ait olduğu belirlenmiştir. Ek olarak R4-1 numunesine ait 724,96 ve 1207,87, R3-1 numunesine ait 725,63 ve 1208,67 ve R3-24 numunesine ait 725,99 ve 1209,30 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler pirofosfat ($P_2O_7^{2-}$) fazını temsil etmektedir. Ayrıca pik şiddetleri kıyaslandığında $P_2O_7^{2-}$ karakteristik piklerinin R4-1 numunesinde daha yüksek

olduğu gözlenmektedir. Ek olarak, artan yaşlandırma süresiyle de kalsiyum pirofosfat pik şiddetinin azaldığı görülmektedir.

5.5.2 ZrO_2 Radyooapaklaştıcı Ajanı FTIR Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Farklı kurutma yöntemleriyle üretilen ZrO_2 toz numunelerine ait FTIR spektrumları Şekil 5.17'de verilmektedir.



Şekil 5.17 Farklı kurutma yöntemleriyle üretilen ZrO_2 toz numunelerine ait FTIR spektrumları

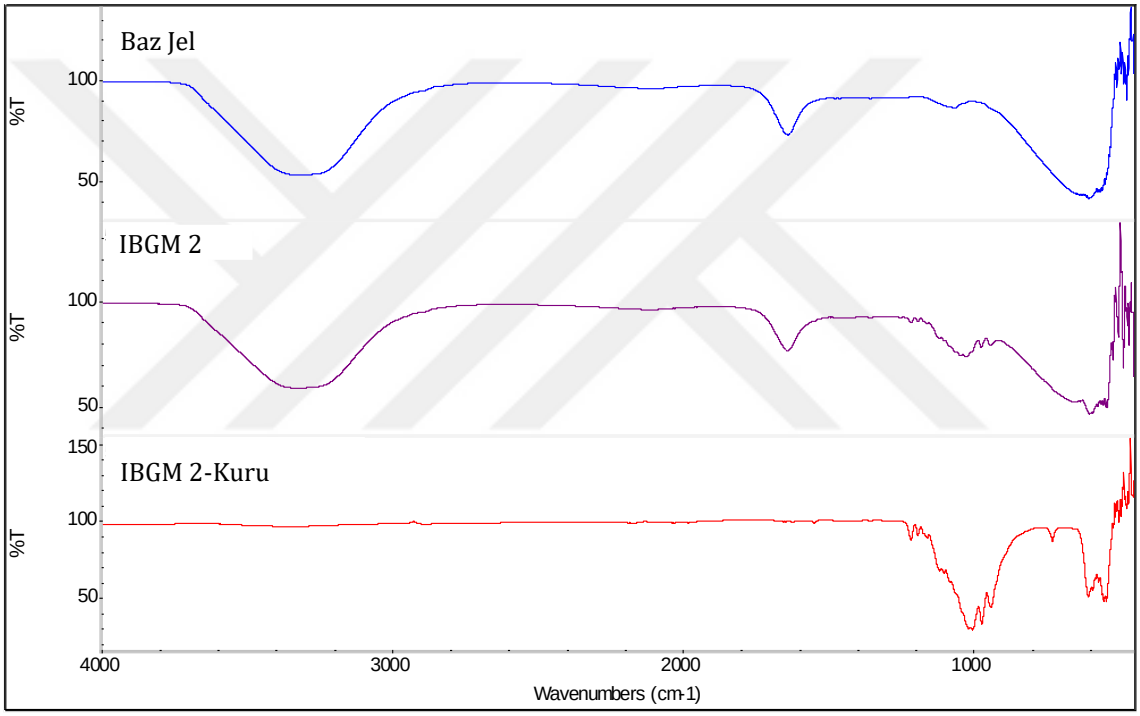
Yapılan çalışmalar, saf ZrO_2'nin 400°C sıcaklık üzerinde kristallenmeye başladığını, bu sıcaklığın altında ise amorf yapıda olduğunu göstermektedir [315]. Bu nedenle, 1100°C'de sinterleme işlemine tabi tutulan numunelerin kristalin yapıda olması beklenmektedir. Ayrıca pik şiddetleri, kurutma yöntemine göre su moleküllerinin yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak değişmektedir. Yapıdan suyun uzaklaşmasıyla absorpsiyon bandı yoğunluğunun azaldığı bilinmektedir [316], [317].

Farklı kurutma yöntemleriyle sentezlenen ZrO_2 tozları için 490-505 cm^{-1} bölgesinde gözlemlenen keskin pikler, kristal faz olarak ZrO_2 yapısının oluşumunu doğrulayan ZrO_3^{2-} gruplarının titreşim modlarını (Zr-O gerilme titreşimleri) temsil etmektedir.

Sırasıyla 2337,60 cm^{-1}, 2338,79 cm^{-1} ve 2338,48 cm^{-1} dalga boyu değerindeki pikler ise hidroksil zirkonyum (Zr-OH) bağının gerilme titreşimini gösterir. Ek olarak, yalnızca etüv kurutmaya tabi tutulmuş numunede gözlenen 1100 ve 1000 cm^{-1} dalga boyundaki piklerin, zirkonyum okside bağlanan hidroksil gruplarının bükülme titreşimine ait olduğu düşünülmektedir [318].

5.5.3 HA/NCC Jel ve Enjekte Edilebilir Greft Malzemesi FTIR Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Deneysel çalışmalar kapsamında geliştirilen enjekte edilebilir greft malzemesine (baz jel, yaş ve kuru numune) ait FTIR spektrumları Şekil 5.18'de sunulmaktadır.



Şekil 5.18 Enjekte edilebilir greft malzemesine ait FTIR spektrumları

Spektrumlar incelendiğinde baz jele ait 3320,29 cm^{-1}, 2112,95 cm^{-1} ve 1635,81 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler ve 50:50 jel/toz oranına ve CA ilavesine sahip yaş numuneye ait 3319,98 cm^{-1}, 2115,36 cm^{-1} ve 1639,27 cm^{-1} pikler sırasıyla yapıdaki suyun -OH gerilmelerini, karbonil grubu -OH gerilmelerini ve amid karbonil germe bantlarını temsil etmektedir. Bu piklerin varlığı yapının sodyum hiyalüronat esaslı olduğunu göstermektedir [319], [320]. Kuru numuneye ait 471,80 (v2), 556,55 (v4),

969,14 (v1) ve 1063,921 (v3) cm^{-1} pikler ise trikalsiyum fosfatların karakteristik fosfat gerilme ve titreşim spektrumlarını temsil etmektedir. Formülasyonda kullanılan NCC ve CA oranlarının az miktalarda olmaları ve sodyum hiyalüronat ile trikalsiyum fosfatların karakteristik piklerinin baskın olması sonucu, NCC ve CA pikleri belirlenememiştir. Ayrıca suya ait OH pikinin geniş olması da bu piklerin tespit edilmesini zorlaştırmaktadır.

5.6 Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Geliştirilen 50:50 jel/toz oranına sahip sitrik asit ilaveli enjekte edilebilir greft malzemesine (IBGM 2) ait kantitatif tayin sonuçları Tablo 5.6'da verilmektedir.

Ürünün kimyasal bileşiminde; Cr (106,16±11,57 ng/g), Co (85,16±9,37 ng/g), Ni (625,63±15,02 ng/g), Cu (4,526±0,407 µg/g), Zn (3,061±0,135 µg/g), As (35,74±3,25 ng/g), Cd (77,67±5,90 ng/g), Ba (3,990±0,319 µg/g), Pb (2,652±0,154 µg/g), Hg (132,18±11,24 ng/g) değerlerinde tespit edilmiştir.

Tablo 5.6 IBGM 2'ye ait kantitatif tayin sonuçları

ELEMENT	KONSANTRASYON (ppm)
Cr	0,106±0,0115
Co	0,085±0,009
Ni	0,625±0,015
Cu	4,526±0,407
Zn	3,061±0,135
As	0,035±0,003
Cd	0,077±0,005
Ba	3,990±0,319
Pb	2,652±0,154
Hg	0,132±0,011

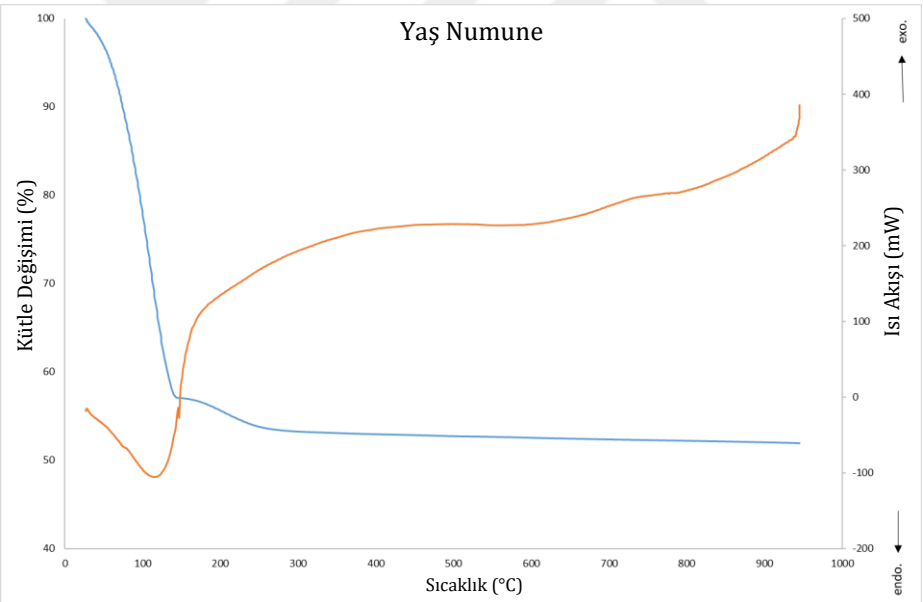
Belirlenen değerlerin BS ISO 13175-3:2012 "Cerrahi İmplantlar - Kalsiyum Fosfatlar Bölüm 3: Hidroksiapatit ve Beta-Trikalsiyum Fosfat Kemik İkameleri" (*Implants for*

surgery - Calcium phosphates Part 3: Hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate bone substitutes) standardında tanımlanan eser elementlere ait maksimum limitlerin altında olduğu belirlenmiştir.

5.7 Termal Analiz (Termogravimetrik Analiz (TGA)- Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)) Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Termogravimetrik analiz, kontrollü bir atmosferde artan sıcaklıkla beraber fiziksel veya kimyasal bağların kopması sonucu numunenin kütlesinde meydana gelen değişimlerin kantitatif olarak değerlendirilmesidir. Diferansiyel taramalı kalorimetre ise referans ve numuneye ait ısı akışı arasındaki farkı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak inceleyen termal analiz yöntemidir [321], [322], [323].

Yaş enjekte edilebilir greft malzemesi ve 37°C'de düşük vakum koşullarında elde edilen kuru numuneye ait TGA/DSC eğrileri sırasıyla Şekil 5.19 ve Şekil 5.20'de gösterilmektedir.

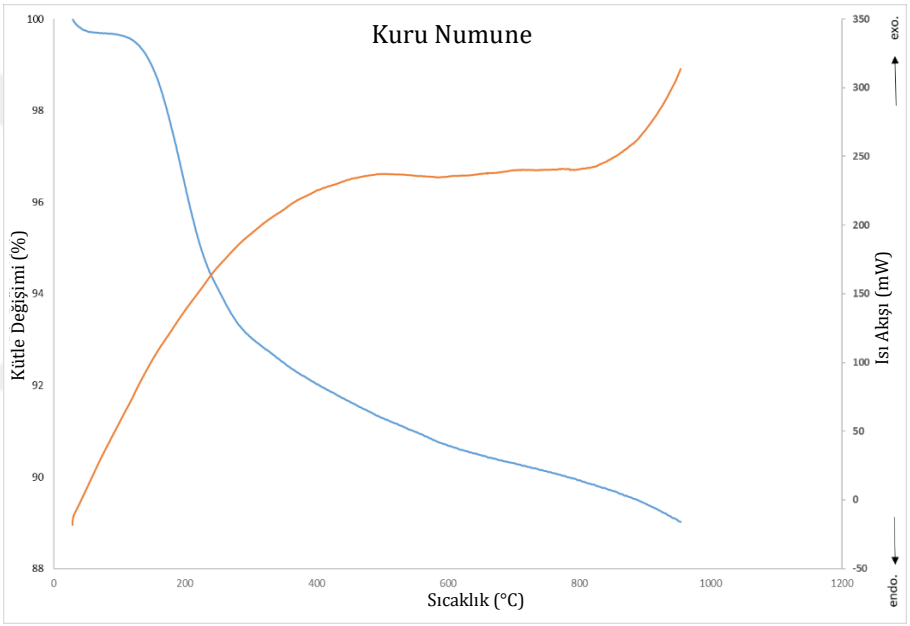


Şekil 5.19 Yaş enjekte edilebilir greft malzemesine ait TGA/DSC eğrisi

TGA termogramları incelendiğinde, yaş numunede %48'lik ve kuru numunede ise %11'lik toplam kütle kaybı olduğu görülmektedir. Yaş numunede, oda sıcaklığı ile 150°C arasındaki ve 250°C'de gözlenen endotermik pikler, fiziksel ve kimyasal bağlı

suyun yapıdan uzaklaşmasıyla meydana gelen sırasıyla, %43 ve %3'lük kütle kayıplarını temsil etmektedir. Bu durum, oda sıcaklığından başlayarak 250°C'ye kadar meydana gelen şiddetli kütle kaybını açıklamaktadır. Kuru numunede ise ilk kütle kaybı (%4) oda sıcaklığı ile 200°C arasında meydana gelmektedir. Bu durum, serbest ve yapısal suyun buharlaşmasına karşılık gelmektedir.

Literatürdeki çalışmalarda, 200°C'nin üzerindeki sıcaklıkların hiyalüronik asit sodyum tuzunun bozulmasına neden olduğu bilinmektedir [324]. Kuru numuneye ait eğrideki diğer pikler incelendiğinde 200 °C ve 300 °C'de gerçekleşen iki aşamalı polisakkarit bozunması karakteristik pikleri görülmektedir. Daha sonra gözlenen şiddetli ağırlık kaybı ise HA'nın degradasyonuyla ilişkilidir.

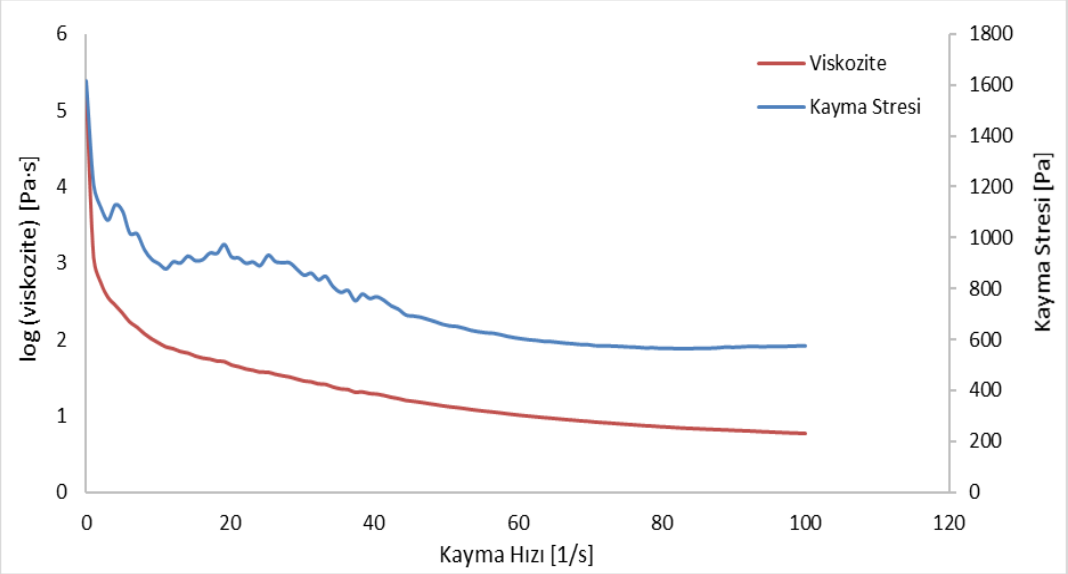


Şekil 5.20 37°C'de düşük vakum koşullarında elde edilen kuru numunelere ait TGA/DSC eğrisi

5.8 Reometre Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Günümüzde, cerrahi operasyon süresini kısaltan, hızlı iyileşme olanağı sağlayan, postoperatif ağrı ve skar oluşumunu minimize eden enjekte edilebilir ürünlerin klinik üstünlükleri bilinmesiyle beraber reolojik davranışları üzerine yapılan çalışmalar halen sürdürülmektedir. CaP içeren ürünlerin akış özelliklerini değiştirmek amacıyla çeşitli polisakkaritler, laktik asit, gliserol, polivinil alkol veya

kitosan kullanımı gibi farklı stratejiler üzerine çalışmalar sürdürülmektedir [325]. Bunun nedeni enjekte edilebilir ürünün hasarlı bölgeye aktarımı sırasında dar ve nispeten uzun bir kanaldan geçmesi gerekliliğidir. Böylece, biyopolimerik taşıyıcı faz ve aktif biyoseramik katıların iş birliği ile üretilen enjekte edilebilir greftlerin kemik dokunun mekanik ve biyolojik ihtiyaçlarını karşılaması gerekliliği yanısıra reolojik davranışları da klinik kullanım kolaylığı açısından kritik öneme sahiptir. Geliştirilecek ürünün faz ayrımını engelleyecek stabiliteye ve enjeksiyon kolaylığı sağlayacak uygun viskoziteye sahip olması beklenmektedir. Tez çalışması kapsamında elde edilen kullanılan akışkanın (IBGM 2) reolojik özellikleri reometre (Anton Paar, MCR 302) ile karakterize edilmiştir. Uygulanan kayma hızının bir fonksiyonu olarak 0-100 s^{-1} aralığında viskozitede meydana gelen değişimlerin belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Kullanılan akışkanın viskozite-kayma hızı grafiği Şekil 5.21'de verilmektedir.



Şekil 5.21 IBGM 2'ye ait viskozite-kayma hızı grafiği

Viskozite, η, bir akışkanın akmaya karşı gösterdiği direnci ifade etmektedir. Akışkan özellikli bir malzemeye kayma gerilimi uygulandığında deformasyon olur. Esasen viskozite, bir malzemenin strese tepki olarak deformasyona direnme kabiliyetinin bir ölçümüdür [326]. Eğer viskozite değerleri numuneye uygulanan kesme hızına bağlı değilse, ürün Newtonyen davranış sergilemektedir. Örneğin su gibi Newtonyen

akışkanlarda uygulanan kayma gerilmesiyle kayma hızı doğru orantılı olup, viskozite değişmemektedir. Buna karşılık, Newtonyen olmayan akışkanlarda kayma stresi ile deformasyon oluşum hızı arasında doğrusal bir ilişki bulunmamaktadır. Zamana bağımlı veya bağımsız olarak, uygulanan kesme hızı arttığında viskozite değerlerinin düşmesi, numunenin Newtonyen olmayan davranışa sahip olduğu anlamına gelmektedir [327], [328]. Kayma hızının artmasıyla beraber viskozite değerlerinde azalma meydana gelen akışkanlar "psödoplastik sıvılar" olarak tanımlanmaktadır. Bu tür akışkanlar, matematiksel modeller kullanılarak karakterize edilmektedir. Aynı zamanda kayma incelmesi veya kalınlaşması olarak da bilinen psödoplastik sıvı davranışları basit ve kullanışlı olması nedeniyle üssel modelleme kullanılarak (Power Law, Eşitlik 5.5 ve 5.6) değerlendirilmektedir [329].

$$\text{Kayma Stresi, } \tau, \text{ (Pa)} = K * (\text{Kayma Hızı, } \gamma \text{ (1/s)})^{n} \quad (5.5)$$

$$\text{Log } (\tau) = \log (K) + n * \log (\gamma) \quad (5.6)$$

Formülde n katsayısı akış davranış indisini ve K ise akışkanlık katsayısını ifade etmektedir. n= 1 değeri Newtonyen akışı ifade etmektedir. Bu durumda K indisi viskoziteye eşit olmaktadır [330]. Ayrıca, n< 1 değerleri kayma incelmesini ve n> 1 ise kayma kalınlaşmasını ifade etmektedir [331].

Polimer esaslı malzemelerde viskozite, uygulanan kesme gerilimine bağlıdır. Yapıda bulunan polimer zincirleri önce akış yönüne paralel olarak yönlenir ve uzar. Bu durum polimer tarafından uygulanan akış direncini düşürerek viskoziteyi de azaltmaktadır [332]. HA gibi Newtonyen olmayan biyopolimerik akışkanlarda, kesme hızı değiştikçe viskozitenin değiştiği, yani artan kesme hızıyla viskozitenin azaldığı (kayma incelmesi) bilinmektedir [333]. HA çözeltilerinin kayma incelmesi davranışı molekül içi hidrojen bağlarının yok edilmesi ve kesme hızının artmasıyla birlikte oluşan hidrofobik etki ile ilişkilidir. Son olarak kesme hızındaki artış molekül zincirlerinde deformasyonlara neden olmakta, zincirlerin akış yönü etkilenmekte ve çözelti viskozitesinde azalma gözlenmektedir. Ayrıca, kayma etkisinin ortadan kaldırılmasıyla HA zincirleri ilk yapıya geri dönebilme kabiliyetine, yani üç boyutlu polimer ağının yok edilmesi tersinir özelliğe sahiptir

[334]. Ek olarak, polimer çözeltilerdeki HA'nın artan moleküler ağırlığı ve konsantrasyonuyla ilişkili olarak, polimerin üç boyutlu ağ yapısı güçlenmekte ve böylece, çözelti viskozitesinde ve viskoelastisitesinde bir artış meydana gelmektedir. Buna karşılık HA'nın azalan moleküler ağırlıklarında polimer ağlarının çözülmesi ve viskoz davranış sergilemesi kolaylaşmaktadır [335].

Geliştirilen enjekte edilebilir ürüne ait n değeri üssel modelleme kullanılarak hesaplanmıştır. 50:50 jel/toz oranına ve CA ilavesine sahip ürünün (IBGM 2) akış davranış indisi, n=0,187 olarak belirlenmiştir. Bu değer literatürdeki verilerle de uyumlu olarak <1 olması nedeniyle kayma incelmesi davranışını ifade etmektedir.

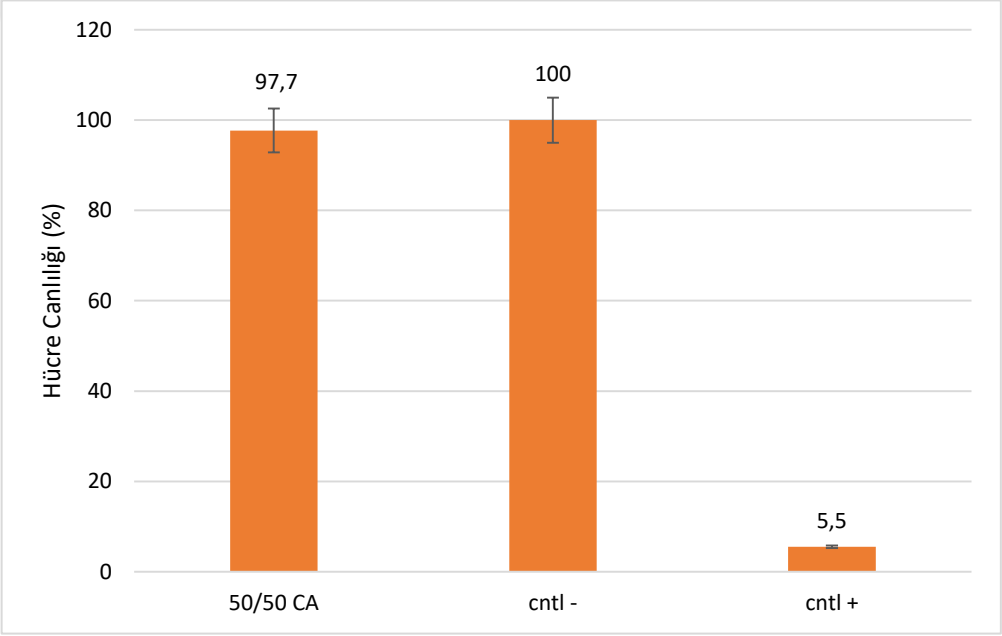
5.9 Hücre Kültürü Çalışması Sonuçları ve Değerlendirilmesi

In vitro biyouyumluluk çalışmalarında sitotoksisite testleri sıklıkla kullanılmaktadır. Sitotoksisite testleri, medikal cihazların güvenliğinin tespitinde uygulanacak birincil yöntemdir [336]. Hücre canlılığı değerlendirmesi, analiz edilecek numunenin uygun hücre kültürü ortamında pozitif yönde hücre proliferasyonunu arttıran ve sitotoksik etki oluşturmayan aralığın tesbitini gösterdiği gibi negatif kontrol grupları kullanılarak hücre canlılığının veya ölümlerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Tetrazolyum bileşikleri kullanılarak yapılan testler, bu tuzların elektron alarak indirgenmeleriyle "formazan kristal" adı verilen yapının oluşumu ve böylece, renk değişimi ile sonuçlanmaktadır. Tetrazolyum halkalarının canlı hücrelerin aktif mitokondrileri tarafından kırılabilmeleri nedeniyle, MTT formazan kristali miktarının ve renk değişikliğinin doğrudan canlı hücrelerin varlığıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir [337], [338].

MTT hücre canlılığı çalışmaları temel olarak hücrelerin sterilize edilmiş test numunesine maruz bırakılması, ardından test edilen maddenin ortamdan uzaklaştırılarak sarı renkli MTT bileşiğinin (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) ortama ilavesi ve inkübasyon süreçlerini içermektedir. Canlı hücreler mor renkli formazan kristal oluşumu sağlamaktadır. Suda çözünmeyen bu yapı uygun bir çözücüde, örneğin; dimetil sülfoksit (DMSO),

çözündürülmektedir. Son olarak, fotometrik ölçüm ile hücresel sitotoksik etki (hücre canlılığı) belirlenmektedir [339].

L929 fare fibroblast hücre hatları, tekrarlanabilir büyüme oranları ve biyolojik tepkileri nedeniyle biyomalzemelerin sitotoksik özelliklerinin test edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu hücreler, hücre kültürü koşullarının kolay kontrol edilebilmesi nedeniyle tıbbi cihazların testi için uluslararası standartlarca önerilmektedir [340]. Belirlenen optimum özelliklere sahip IBGM 2 numunesinin sitotoksik etkisi (MTT- *In Vitro* Sitotoksisite/Hücre Canlılığı Testi) ISO 10993-5 standardına (Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- bölüm 5: Vücut dışı sitotoksisite deneyleri) uygun olarak belirlenmiştir. MTT hücre canlılığı (%)'sine ait sütun grafiği Şekil 5.22'de verilmektedir.



Şekil 5.22 MTT hücre canlılığı (%)'sine ait sütun grafiği

Grafikte de belirtildiği üzere test edilen IBGM 2 numunesinin hücre canlılığı **%97,7** olarak tespit edilmiştir. İlgili standarda göre hücre canlılığında %30'dan fazla meydana gelen kayıplar sitotoksik etki olarak kabul edilmektedir [341]. Değerlendirme sonucu elde edilen hücre canlılığı (%)'sinin standardın belirttiği minimum değerden (%70) yüksek olduğu tespit edilmiştir.

5.10 Genel Değerlendirme ve Yorumlar

Deneysel çalışmalar kapsamında, kemik doku mühendisliği uygulamalarında doğrudan kullanıma uygun ve rejeneratif özellikli enjekte edilebilir greft malzemesi geliştirilmesi amacıyla ağırlıkça 25:75, 35:65, 40:60 ve 50:50 jel/toz oranlarına sahip numuneler hazırlanmıştır. Biyoaktif faz olarak β-TCP ve taşıyıcı sistem olarak HA/NCC jel içeren numuneler malzemenin görüntülenebilirliğinin sağlanması amacıyla ZrO_2 radyoopaklaştırıcı ajanı ilavesi de içermektedir. Bununla birlikte belirtilen jel/toz oranlarına sahip numuneler CA ilavesinin stabiliteye etkisinin belirlenmesi amacıyla CA ilaveli ve ilavesiz olarak hazırlanmıştır.

Enjekte edilebilir greft malzemesinin geliştirilmesinde öncelikle biyoaktif faz olarak kullanılacak β-TCP biyoseramiğinin optimum sentez koşullarının belirlenmesi amacıyla farklı pH ve yaşlandırma süreleri üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Aynı amaçla, enjekte edilebilir yapıya ilave edilecek ZrO_2 seramiği farklı kurutma koşullarına tabi tutularak, kurutmanın morfoloji ve aglomerasyon eğilimi üzerine etkileri incelenmiştir.

Deneysel çalışmalar kapsamında geliştirilen enjekte edilebilir greftlere ait sonuçlar ve değerlendirme aşağıda özetlenmiştir:

- %0,1, %0,3, %0,5 oranlarında NCC içeren HA jellerinin sahip olduğu zeta potansiyel değerleri kıyaslandığında %0,1 NCC içeren jelin (J1) en yüksek mutlak zeta potansiyel değerine yani, en yüksek faz kararlılığına, sahip olduğu tespit edilmiştir.
- 25:75, 35:65, 40:60 ve 50:50 CA ilaveli/CA ilavesiz olarak hazırlanan 8 adet numunede artan jel miktarları ile faz ayrımı sergileme eğiliminin arttığı ve 50:50 jel/toz oranlarına sahip numuneler (IBGM 1 ve 2) hariç diğer 6 numunede partikül aglomerasyonu meydana geldiği belirlenmiştir.
- IBGM 1 ve IBGM 2 numunelerine ait zeta potansiyel değerleri kıyaslandığında az miktarda CA ilavesi ile yapının kararlılığının artmakta olduğu görülmektedir.

- Analiz öncesi numunelerin hazırlanması kapsamında enjekte edilebilir greft malzemesi SEM-EDS analiz protokolünde belirtildiği şekilde kurutulmuştur. Bu nedenle IBGM 2'ye ait SEM görüntülerinde ağırlıklı olarak β-TCP'ye ait kümeler ve küresel morfolojiye sahip parçacıklar gözlenmektedir.
- IBGM 2'de kullanılan NCC ve CA oranlarının az miktalarda olmaları ve sodyum hiyalüronat ve trikalsiyum fosfatların karakteristik piklerinin baskın olması sonucu FTIR analizinde NCC ve CA pikleri tespit edilememiştir.
- 50:50 jel/toz oranına sahip CA ilaveli IBGM 2'ye ait ICP-MS analizi kantitatif tayin sonuçlarının BS ISO 13175-3:2012 standardında eser elementlere ait tanımlanan maksimum değerlerin altında olduğu belirlenmiştir.
- Geliştirilen IBGM 2 numunesinin reometre ile viskozite ölçümü sonucunda değerinin 1'den küçük olduğu hesaplanmış ve kayma incelmesi davranışı sergilediği tespit edilmiştir.
- Optimum özelliklere sahip IBGM 2'nin sitotoksik etkisi MTT- *In Vitro* Sitotoksisite/Hücre Canlılığı Testi ile ISO 10993-5 standardına uygun olarak gerçekleştirilmiş olup, hücre canlılığı %97,7 olarak belirlenmiştir.

β-TCP biyoseramiği sentez koşullarının optimizasyonu kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlendiği gibidir:

- Yüksek pH değerlerinin elde edilmesi için gerekli amonyak ilavesi β-TCP'nin saflığını etkilemektedir. Ayrıca artan amonyak miktarının üretilen tozun sertliğini de arttırdığı gözlenmiştir.
- Farklı koşullarda üretilmiş β-TCP tozlarından, R4-1 numunesine ait XRD sonuçları JCPDS No: 09-0346 ile uyumlu olarak yapının β-$Ca_2P_2O_7$ fazından oluştuğunu göstermiştir. R3-1 ve R3-24 numunelerinde ise JCPDS No: 09-0169 ile uyumlu olarak yapıların β-TCP'ye ait olduğu belirlenmiştir.
- SEM görüntüleri incelendiğinde pH 5,8 ve 7 değerlerinde sentezlenmiş β-TCP biyoseramiklere ait morfolojilerin pH değişiminden ve ayrıca 1 saat ve 24 saat olmak üzere uygulanan yaşlanma sürelerinden etkilendiği gözlenmiştir. pH 7 numunelerinde (R3-1 ve R3-24) daha küresel yapılar elde edilmiş olup

artan yaşlanma süresi ile partikül aglomerasyon eğiliminin arttığı tespit edilmiştir.

- EDS analizi sonuçlarına göre ise artan pH ve yaşlandırma süreleri ile Ca/P mol oranının arttığı belirlenmiştir.

Farklı kurutma koşullarının ZrO_2 seramiğinin morfoloji ve aglomerasyon eğilimi üzerine etkilerinin belirlenmesi kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Etüv, liyofilizatör ve rotary kurutmaya tabi tutulmuş ZrO_2 toz numunelerinden en küçük ortalama zeta tane boyutunun etüv kurutma yöntemine ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca zeta potansiyel ölçümü sonuçlarına göre en yüksek stabilite ve PDI indekslerine göre en homojen partikül boyut dağılımının etüv kurutma ile elde edildiği tespit edilmiştir.
- Kimyasal çöktürme yöntemi ile sentezlenen ZrO_2 seramiğine ait XRD sonuçları yapının %96 oranında monoklinik ZrO_2 olduğunu kanıtlamaktadır.
- Liyofilizasyona tabi tutulan ZrO_2 seramiğine ait SEM görüntülerinde gözlenen yüksek topaklanma eğilimine sahip düzensiz şekilli plaka benzeri yapıların, kurutmanın tamamen gerçekleşmemesi sonucu yapıda bir miktar suyun kalması sonucunda oluştuğu düşünülmüştür.
- Rotary kurutmayla elde edilen ZrO_2 toz numunede yüksek aglomerasyon eğilimine sahip küresel yapıların, rotasyon hareketiyle ilişkili olarak partiküllerin çarpışmasının bir sonucu olabileceği düşünülmüştür.
- Etüv kullanılması durumda ise, küresel morfolojiye ve diğer kurutma yöntemlerine kıyasla daha düşük aglomerasyon eğilimine sahip ZrO_2 tozunun elde edildiği gözlenmiştir. Bu durum, suyun uzaklaştırılması işleminin etüv kurutma yönteminde daha yüksek verimle gerçekleştiğini göstermektedir.
- Farklı kurutma yöntemleriyle üretilen ZrO_2 biyoseramik tozlarına ait FTIR spektrumlarının literatürdeki ZrO_2 karakteristik pikleriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Özetle; sunulan tez çalışması kapsamında optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş β-TCP ve ZrO_2 biyoseramik tozları, en yüksek kararlılığa sahip HA/NCC jel ile bir araya getirilerek IBGM üretimi gerçekleştirilmiş ve faz ayrışması sorununun önüne geçecek optimum jel/toz oranı belirlenmiştir. CA ilavesinin ise yapının stabilitesini olumlu yönde etkilediği gözlenmiştir. Ayrıca, geliştirilen ürünün sitotoksik etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda; doğrudan klinik kullanıma uygun ve minimal invazif ameliyat yoluyla hasarlı bölgeye uygulanabilecek potansiyel enjekte edilebilir greft malzemesi geliştirilmiştir. Ancak ilgili konunun aşağıda maddeler halinde belirtildiği üzere araştırılması gereken çeşitli deneysel parametreleri ve optimizasyon gerekliliği bulunmaktadır:

- ZrO_2 radyoopaklaştırıcı ajanının görüntülenebilirliğe etkisinin belirlenmesi amacıyla mikro bilgisayarlı tomografi (μ-CT) gerçekleştirilmelidir.
- Geliştirilen ürünün kemik dokunun iyileşme sürecini destekleyecek optimum degradasyon profiline sahip olup olmadığı belirlenmelidir.
- Enjekte edilebilir ürünün uygulama ve depolama koşulları optimize edilmelidir.
- IBGM numunelerden salınan iyon miktarı ve salım profili tespit edilmelidir.
- Geliştirilen ürünün enjekte edilebilirlik özellikleri basma testi ile incelenmelidir.
- Klinik talepleri karşılama potansiyeli bulunan IBGM numunesi için *in vivo* hayvan deneyleri planlanmalıdır.

Bu nedenle ilerleyen çalışmalar ürünün klinik kullanıma sunulabilir özellikleri tam olarak sağlaması için performansının iyileştirilmesi ve *in vivo* çalışmaların tamamlanması yönünde sürdürülecektir.

KAYNAKÇA

[1] H. Zhou, S. S. Lu, and D. W. Dempster, "Bone remodeling: cellular activities in bone," in Osteoporosis in Men, Elsevier, pp. 15-24, 2010

[2] H. Ji-Ye, Z. Xin-Feng, and J. Lei-Sheng, "Autonomic control of bone formation: its clinical relevance," in Handbook of clinical neurology. vol. 117, Elsevier, pp. 161-171, 2013.

[3] R. Donev, Chromatin Proteins and Transcription Factors as Therapeutic Targets: Academic Press, 2017.

[4] P. Diaz-Rodriguez, M. López-Álvarez, J. Serra, P. González, and M. Landín, "Current stage of marine ceramic grafts for 3D bone tissue regeneration," Marine drugs, vol. 17, p. 471, 2019.

[5] G. Cama, B. Gharibi, J. Knowles, S. Romeed, L. DiSilvio, and S. Deb, "Structural changes and biological responsiveness of an injectable and mouldable monetite bone graft generated by a facile synthetic method," Journal of The Royal Society Interface, vol. 11, p. 20140727, 2014.

[6] S. Caldwell, "Bone Grafting Complications," in Misch's Avoiding Complications in Oral Implantology, ed: Elsevier, pp. 440-498, 2018.

[7] A. Jamelle, R. Hill, and D. Gillam, "In-vitro properties of calcium phosphate cement as a bone grafting material," International Dental Journal of Students Research, vol. 3, pp. 43-48, 2015.

[8] R. Pilliar, M. Filiaggi, J. Wells, M. Grynpas, and R. Kandel, "Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications-in vitro characterization," Biomaterials, vol. 22, pp. 963-972, 2001.

[9] J. Parvizi, High Yield Orthopaedics E-Book: Elsevier Health Sciences, 2010.

[10] K. Bardsley, A. J. Deegan, A. El Haj, and Y. Yang, "Current state-of-the-art 3D tissue models and their compatibility with live cell imaging," in Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models, ed: Springer, pp. 3-18, 2017.

[11] V. Lalzawmliana, A. Anand, P. Mukherjee, S. Chaudhuri, B. Kundu, S. K. Nandi, et al., "Marine organisms as a source of natural matrix for bone tissue engineering," Ceramics International, vol. 45, pp. 1469-1481, 2019.

[12] S. Y. Shin, H. F. Rios, W. V. Giannobile, and T.-J. Oh, "Periodontal regeneration: Current therapies," in Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences, Elsevier, pp. 459-469, 2015.

[13] E. R. Carlisle and J. S. Fischgrund, "Bone Graft and Fusion Enhancement," in Surgical Management of Spinal Deformities, Elsevier, pp. 433-448, 2009.

[14] Z. T. Birgani, A. Malhotra, L. Yang, B. Harink, and P. Habibovic, "Calcium Phosphate Ceramics With Inorganic Additives," Comprehensive Biomaterials II, p. 406, 2017.

[15] F. Matassi, L. Nistri, D. C. Paez, and M. Innocenti, "New biomaterials for bone regeneration," Clinical cases in mineral and bone metabolism, vol. 8, p. 21, 2011.

[16] R. A. Horowitz, Z. Mazor, C. Foitzik, H. Prasad, M. Rohrer, and A. Palti, "β-tricalcium phosphate as bone substitute material: properties and clinical applications," Journal of Osseointegration, vol. 2, pp. 61-68, 2010.

[17] P. Ducheyne and Q. Qiu, "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function," Biomaterials, vol. 20, pp. 2287-2303, 1999.

[18] P. Ducheyne, Comprehensive biomaterials II: Elsevier, 2017.

[19] T. T. Roberts and A. J. Rosenbaum, "Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing," Organogenesis, vol. 8, pp. 114-124, 2012.

[20] N. Eliaz and N. Metoki, "Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications," Materials, vol. 10, p. 334, 2017.

[21] S. Nandi, S. Roy, P. Mukherjee, B. Kundu, D. De, and D. Basu, "Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review," Indian Journal of Medical Reseach, vol. 132, pp. 15-30, 2010.

[22] J. Huang, "Design and development of ceramics and glasses," in Biology and Engineering of Stem Cell Niches, ed: Elsevier, pp. 315-329, 2017.

[23] N. Kondo, A. Ogose, K. Tokunaga, T. Ito, K. Arai, N. Kudo, et al., "Bone formation and resorption of highly purified β-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle," Biomaterials, vol. 26, pp. 5600-5608, 2005.

[24] P. Kasten, I. Beyen, P. Niemeyer, R. Luginbühl, M. Bohner, and W. Richter, "Porosity and pore size of β-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study," Acta biomaterialia, vol. 4, pp. 1904-1915, 2008.

[25] B. Liu and D. x. Lun, "Current application of β-tricalcium phosphate composites in orthopaedics," Orthopaedic surgery, vol. 4, pp. 139-144, 2012.

[26] Y.-F. Feng, L. Wang, X. Li, Z.-S. Ma, Y. Zhang, Z.-Y. Zhang, et al., "Influence of architecture of β-tricalcium phosphate scaffolds on biological performance in repairing segmental bone defects," PLoS One, vol. 7, p. 499-555, 2012.

[27] L. Liang, P. Rulis, and W. Ching, "Mechanical properties, electronic structure and bonding of α-and β-tricalcium phosphates with surface characterization," Acta biomaterialia, vol. 6, pp. 3763-3771, 2010.

[28] D. J. Hak, "The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma," Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, vol. 15, pp. 525-536, 2007.

[29] U. R. Dahiya, S. Mishra, and S. Bano, "Application of Bone Substitutes and Its Future Prospective in Regenerative Medicine," in Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration, IntechOpen, 2019.

[30] D. C. Allison, A. W. Lindberg, B. Samimi, R. Mirzayan, and L. R. Menendez, "A comparison of mineral bone graft substitutes for bone defects," Journal-A Comparison of Mineral Bone Graft Substitutes for Bone Defects, 2011.

[31] E. A. Demirci, M. Atagür, O. Karaman, B. B. M. Sanayi, and A. Ticaret, "Enjekte Edilebilir Kemik Greftlerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu Development and Characterization of Injectable Bone Substitutes."

[32] S. V. Dorozhkin, "Self-setting calcium orthophosphate formulations," Journal of functional biomaterials, vol. 4, pp. 209-311, 2013.

[33] U. Balkaya, A. Çördük, and O. Karaman, "Developing Silicate Additive Antibacterial and Osteoinductive Injectable Bone Grafts," in 2019 Medical Technologies Congress (TIPTEKNO), pp. 1-3, 2019.

[34] H. H. Xu, P. Wang, L. Wang, C. Bao, Q. Chen, M. D. Weir, et al., "Calcium phosphate cements for bone engineering and their biological properties," Bone research, vol. 5, pp. 1-19, 2017.

[35] R. Legros and A. Chohayeb, "Apatitic calcium phosphates: possible restorative materials," Journal of Dental Research, vol. 61, p. 343, 1982.

[36] W. Brown, "A new calcium phosphate setting cement," J. Dent. Res., vol. 62, p. 672, 1983.

[37] M. Bohner, "Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution," Eur Cell Mater, vol. 20, pp. 3-10, 2010.

[38] B. İnsal and İ. Pişkin, "Kemik Dokusunun Fizyolojisi," Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, vol. 28, pp. 28-32, 2017.

[39] A. Mizokami, T. Kawakubo-Yasukochi, and M. Hirata, "Osteocalcin and its endocrine functions," Biochemical pharmacology, vol. 132, pp. 1-8, 2017.

[40] J. S. Khurana and F. F. Safadi, "Bone structure, development and bone biology," in Essentials in Bone and Soft-Tissue Pathology, Springer, pp. 1-15, 2010.

[41] J. S. Khurana, E. F. McCarthy, and P. J. Zhang, Essentials in bone and soft-tissue pathology: Springer Science & Business Media, 2010.

[42] B. Clarke, "Normal bone anatomy and physiology," Clinical journal of the American Society of Nephrology, vol. 3, pp. S131-S139, 2008.

[43] M. Capac. (2009). İnsan kadın iskeletinin çizimi. Available: https://tr.wikipedia.org

[44] R. K. Fuchs, W. R. Thompson, and S. J. Warden, "Bone biology," in Bone Repair Biomaterials, Elsevier, pp. 15-52, 2019.

[45] F. Johannesdottir and M. L. Bouxsein, "Bone Structure and Biomechanics," Elsevier, pp. 19-30, 2018.

[46] C. M. Gdyczynski, A. Manbachi, S. Hashemi, B. Lashkari, and R. S. C. Cobbold, "On estimating the directionality distribution in pedicle trabecular bone from micro-CT images," Physiological measurement, vol. 35, p. 2415, 2014.

[47] R. Murugan and S. Ramakrishna, "Development of nanocomposites for bone grafting," Composites Science and technology, vol. 65, pp. 2385-2406, 2005.

[48] E. F. Morgan, G. U. Unnikrisnan, and A. I. Hussein, "Bone mechanical properties in healthy and diseased states," Annual review of biomedical engineering, vol. 20, pp. 119-143, 2018.

[49] B. Mubeen, I. Ahmed, and A. Jameel, "Study of mechanical properties of bones and mechanics of bone fracture," in Proceedings of 60th Congress of ISTAM, 2015.

[50] S. R. Paital and N. B. Dahotre, "Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: materials, performance factors, and methodologies," Materials Science and Engineering: R: Reports, vol. 66, pp. 1-70, 2009.

[51] D. P. Fyhrie and B. A. Christiansen, "Bone material properties and skeletal fragility," Calcified tissue international, vol. 97, pp. 213-228, 2015.

[52] U. Topaloğlu, M. A. Ketani, and B. G. Saruhan, "Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri," Dicle Üniv Vet Fak Derg, vol. 10, pp. 62-71, 2017.

[53] B. Brodsky and A. V. Persikov, "Molecular structure of the collagen triple helix," in Advances in protein chemistry. vol. 70, Elsevier, pp. 301-339, 2005.

[54] F. Van den Berg, "Extracellular matrix," Fascia: The Tensional Network of the Human Body, pp. 165-170, 2013.

[55] E. F. Morgan, G. L. Barnes, and T. A. Einhorn, "The bone organ system: form and function," in Osteoporosis, ed: Elsevier, pp. 3-20, 2013.

[56] S. Behzadi, G. A. Luther, M. B. Harris, O. C. Farokhzad, and M. Mahmoudi, "Nanomedicine for safe healing of bone trauma: opportunities and challenges," Biomaterials, vol. 146, pp. 168-182, 2017.

[57] M. Ansari, "Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies," Progress in biomaterials, pp. 1-15, 2019.

[58] P. A. Downey and M. I. Siegel, "Bone biology and the clinical implications for osteoporosis," Physical therapy, vol. 86, pp. 77-91, 2006.

[59] C. B. Erickson and K. A. Payne, "Inductive Signals and Progenitor Fates During Osteogenesis," 2018.

[60] V. I. Sikavitsas, J. S. Temenoff, and A. G. Mikos, "Biomaterials and bone mechanotransduction," Biomaterials, vol. 22, pp. 2581-2593, 2001.

[61] A. C. Allori, A. M. Sailon, and S. M. Warren, "Biological basis of bone formation, remodeling, and repair—part II: extracellular matrix," Tissue Engineering Part B: Reviews, vol. 14, pp. 275-283, 2008.

[62] T. A. Franz-Odendaal, B. K. Hall, and P. E. Witten, "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes," Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, vol. 235, pp. 176-190, 2006.

[63] J. T. Compton and F. Y. Lee, "A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin," The Journal of bone and joint surgery. American volume, vol. 96, p. 1659, 2014.

[64] M. L. K. Tate, J. R. Adamson, A. E. Tami, and T. W. Bauer, "The osteocyte," The international journal of biochemistry & cell biology, vol. 36, pp. 1-8, 2004.

[65] J. M. Quinn and M. T. Gillespie, "Modulation of osteoclast formation," Biochemical and biophysical research communications, vol. 328, pp. 739-745, 2005.

[66] W. J. Boyle, W. S. Simonet, and D. L. Lacey, "Osteoclast differentiation and activation," Nature, vol. 423, pp. 337-342, 2003.

[67] R. Setiawati and P. Rahardjo, "Bone Development and Growth," in Osteogenesis and bone regeneration, IntechOpen, 2018.

[68] C. Hartmann and Y. Yang, "Molecular and cellular regulation of intramembranous and endochondral bone formation during embryogenesis," in Principles of Bone Biology, Elsevier, pp. 5-44, 2020.

[69] S. Provot, E. Schipani, J. Y. Wu, and H. Kronenberg, "Development of the skeleton," in Osteoporosis, Elsevier, pp. 97-126, 2013.

[70] J. A. Gasser and M. Kneissel, "Bone Physiology and Biology," in Bone Toxicology, Springer, pp. 27-94, 2017.

[71] M.-P. Ginebra, M. Espanol, Y. Maazouz, V. Bergez, and D. Pastorino, "Bioceramics and bone healing," vol. 3, pp. 173-183, 2018.

[72] E. Taşan, "Normal Kemik Yapım-yıkım Döngüsü ve Osteoporozun Patogenezi," İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinleri, pp. 17-32, 1999.

[73] Y. Choi, R. Faccio, S. L. Teitelbaum, and H. Takayanagi, "Osteoclast Biology: Regulation of Formation and Function," in Osteoimmunology, Elsevier, pp. 41-70, 2016.

[74] C. R. Black, V. Goriainov, D. Gibbs, J. Kanczler, R. S. Tare, and R. O. Oreffo, "Bone tissue engineering," Current molecular biology reports, vol. 1, pp. 132-140, 2015.

[75] C. Sudhakar, N. Upadhyay, A. Verma, A. Jain, R. N. Charyulu, and S. Jain, "Nanomedicine and tissue engineering," in Nanotechnology Applications for Tissue Engineering, Elsevier, pp. 1-19, 2015.

[76] E. Ergin, Y. Ekici, and F. B. Ataç, "Doku mühendisliği ve uygulama alanları," Türkiye Klinikleri. Tip Bilimleri Dergisi, vol. 38, pp. 70-78, 2018.

[77] M. E. Furth and A. Atala, "Tissue Engineering: Future Perspectives," in Principles of Tissue Engineering, Elsevier, pp. 83-123, 2014.

[78] F. Tonelli, N. De Cássia Oliveira Paiva, R. de Medeiros, M. Pinto, F. Tonelli, and R. Resende, Tissue Engineering: The Use of Stem Cells in Regenerative Medicine, 2016.

[79] M. Ellis, "Two-and three-dimensional tissue culture bioprocessing methods for soft tissue engineering," in Standardisation in Cell and Tissue Engineering, Elsevier, pp. 34-53, 2013.

[80] R. A. Carano and E. H. Filvaroff, "Angiogenesis and bone repair," Drug discovery today, vol. 8, pp. 980-989, 2003.

[81] T. Tariverdian, F. Sefat, M. Gelinsky, and M. Mozafari, "Scaffold for bone tissue engineering," in Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One, Elsevier, pp. 189-209, 2019.

[82] Z.-R. Wang, Y. Cui, and Z.-Y. Qiu, "Biomimetic Mineralized Collagen Biocompatibility," in Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes, Elsevier, pp. 61-98, 2019.

[83] A. Hudecki, G. Kiryczyński, and M. J. Łos, "Biomaterials, Definition, Overview," in Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine, Elsevier, pp. 85-98, 2019.

[84] S.-W. Ha, D. Weiss, M. N. Weitzmann, and G. R. Beck Jr, "Applications of silica-based nanomaterials in dental and skeletal biology," in Nanobiomaterials in Clinical Dentistry, Elsevier, pp. 77-112, 2019.

[85] G. Wypych, Functional Fillers: Chemical Composition, Morphology, Performance, Applications: Elsevier, 2018.

[86] K. Glenske, P. Donkiewicz, A. Köwitsch, N. Milosevic-Oljaca, P. Rider, S. Rofall, et al., "Applications of metals for bone regeneration," International journal of molecular sciences, vol. 19, p. 826, 2018.

[87] F. A. Akin, H. Zreiqat, S. Jordan, M. B. Wijesundara, and L. Hanley, "Preparation and analysis of macroporous TiO2 films on Ti surfaces for bone–tissue implants," Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, vol. 57, pp. 588-596, 2001.

[88] O. Perihan, "Osseointegrasyon ve Kemik Rejenerasyonunda Kemik Doku Mühendisliğinin Yeri," Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, vol. 26, pp. 87-95, 2016.

[89] j. a. Burdick and m. m. Stevens, "Biomedical hydrogels," in Biomaterials, artificial organs and tissue engineering, Elsevier, pp. 107-115, 2005.

[90] O. S. Manoukian, N. Sardashti, T. Stedman, K. Gailiunas, A. Ojha, A. Penalosa, et al., "Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine," 2019.

[91] F. Akter and J. Ibanez, "Bone and cartilage tissue engineering," in Tissue Engineering Made Easy, Elsevier, pp. 77-97, 2006.

[92] R. Z. LeGeros, "Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates," Clinical Orthopaedics and Related Research®, vol. 395, pp. 81-98, 2002.

[93] J. Dong, H. Kojima, T. Uemura, M. Kikuchi, T. Tateishi, and J. Tanaka, "In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells," Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, vol. 57, pp. 208-216, 2001.

[94] H.-W. Kim, J. C. Knowles, and H.-E. Kim, "Hydroxyapatite/poly (ε-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery," Biomaterials, vol. 25, pp. 1279-1287, 2004.

[95] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," Trends in biotechnology, vol. 30, pp. 546-554, 2012.

[96] P. Chocholata, V. Kulda, and V. Babuska, "Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration," Materials, vol. 12, p. 568, 2019.

[97] J. Venkatesan, R. Pallela, and S.-K. Kim, "Applications of carbon nanomaterials in bone tissue engineering," Journal of biomedical nanotechnology, vol. 10, pp. 3105-3123, 2014.

[98] A. T. Banigo, S. C. Iwuji, and N. C. Iheaturu, "Application of biomaterials in tissue engineering: a review," Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, vol. 11, pp. 1-16, 2019.

[99] M. Orciani, M. Fini, R. Di Primio, and M. Mattioli-Belmonte, "Biofabrication and bone tissue regeneration: cell source, approaches, and challenges," Frontiers in bioengineering and biotechnology, vol. 5, p. 17, 2017.

[100] G. G. Walmsley, R. C. Ransom, E. R. Zielins, T. Leavitt, J. S. Flacco, M. S. Hu, et al., "Stem cells in bone regeneration," Stem Cell Reviews and Reports, vol. 12, pp. 524-529, 2016.

[101] T.-M. De Witte, L. E. Fratila-Apachitei, A. A. Zadpoor, and N. A. Peppas, "Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices," Regenerative biomaterials, vol. 5, pp. 197-211, 2018.

[102] E. L. Francois and M. J. Yaszemski, "Preclinical bone repair models in regenerative medicine," in Principles of Regenerative Medicine, Elsevier, pp. 761-767, 2019.

[103] J. L. Brown, S. G. Kumbar, and C. T. Laurencin, "Bone tissue engineering," in Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition, ed: Elsevier Inc., pp. 1194-1214, 2013.

[104] P. Y. Huri, N. Hasırcı, and V. Hasırcı, "Kemik Doku Mühendisliği," Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, vol. 19, pp. 206-219.

[105] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, "Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review," International journal of polymer science, vol. 2011, 2011.

[106] Z. Ge, Z. Jin, and T. Cao, "Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration," Biomedical Materials, vol. 3, p. 022001, 2008.

[107] X. Liu and P. X. Ma, "Polymeric scaffolds for bone tissue engineering," Annals of biomedical engineering, vol. 32, pp. 477-486, 2004.

[108] S. W. Suh, J. Y. Shin, J. Kim, J. Kim, C. H. Beak, D.-I. Kim, et al., "Effect of different particles on cell proliferation in polymer scaffolds using a solvent-casting and particulate leaching technique," ASAIO journal, vol. 48, pp. 460-464, 2002.

[109] M. Mozafari, F. Moztarzadeh, M. Rabiee, M. Azami, S. Maleknia, M. Tahriri, et al., "Development of macroporous nanocomposite scaffolds of gelatin/bioactive glass prepared through layer solvent casting combined with lamination technique for bone tissue engineering," Ceramics International, vol. 36, pp. 2431-2439, 2010.

[110] A. G. Mikos and J. S. Temenoff, "Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering," Electronic Journal of Biotechnology, vol. 3, pp. 23-24, 2000.

[111] B. Subia, J. Kundu, and S. Kundu, "Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications," Tissue engineering, vol. 141, 2010.

[112] K. Rezwan, Q. Chen, J. J. Blaker, and A. R. Boccaccini, "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering," Biomaterials, vol. 27, pp. 3413-3431, 2006.

[113] Q. Chen, "Foaming technology of tissue engineering scaffolds-a review," Bubble Science, Engineering & Technology, vol. 3, pp. 34-47, 2011.

[114] B. Thavornyutikarn, N. Chantarapanich, K. Sitthiseripratip, G. A. Thouas, and Q. Chen, "Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques," Progress in biomaterials, vol. 3, pp. 61-102, 2014.

[115] H.-Q. Liang, Q.-Y. Wu, L.-S. Wan, X.-J. Huang, and Z.-K. Xu, "Polar polymer membranes via thermally induced phase separation using a universal crystallizable diluent," Journal of membrane science, vol. 446, pp. 482-491, 2013.

[116] H. Patel, M. Bonde, and G. Srinivasan, "Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering," Trends Biomater Artif Organs, vol. 25, pp. 20-29, 2011.

[117] E. Sachlos and J. Czernuszka, "Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds," Eur Cell Mater, vol. 5, pp. 39-40, 2003.

[118] E. Babaie and S. B. Bhaduri, "Fabrication aspects of porous biomaterials in orthopedic applications: a review," ACS Biomaterials Science & Engineering, vol. 4, pp. 1-39, 2018.

[119] J. H. Jeon, M. Bhamidipati, B. Sridharan, A. M. Scurto, C. J. Berkland, and M. S. Detamore, "Tailoring of processing parameters for sintering microsphere-based scaffolds with dense-phase carbon dioxide," Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, vol. 101, pp. 330-337, 2013.

[120] Z. Pan and J. Ding, "Poly (lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine," Interface focus, vol. 2, pp. 366-377, 2012.

[121] V. Santos-Rosales, A. Iglesias-Mejuto, and C. A. García-González, "Solvent-Free Approaches for the Processing of Scaffolds in Regenerative Medicine," Polymers, vol. 12, p. 533, 2020.

[122] I. Sopyan and J. Kaur, "Preparation and characterization of porous hydroxyapatite through polymeric sponge method," Ceramics International, vol. 35, pp. 3161-3168, 2009.

[123] C. Wang, H. Chen, X. Zhu, Z. Xiao, K. Zhang, and X. Zhang, "An improved polymeric sponge replication method for biomedical porous titanium scaffolds," Materials Science and Engineering: C, vol. 70, pp. 1192-1199, 2017.

[124] E. Cunningham, G. Walker, F. Buchanan, and N. Dunne, "Bio-inspired calcium phosphate materials for hard-tissue repair," in Biomineralization and Biomaterials, Elsevier, pp. 405-442, 2016.

[125] Q.-Z. Chen and G. A. Thouas, "Fabrication and characterization of sol–gel derived 45S5 Bioglass®-ceramic scaffolds," Acta biomaterialia, vol. 7, pp. 3616-3626, 2011.

[126] M. Houmard, Q. Fu, E. Saiz, and A. P. Tomsia, "Sol–gel method to fabricate CaP scaffolds by robocasting for tissue engineering," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 23, pp. 921-930, 2012.

[127] R. J. Varghese, S. Parani, S. Thomas, O. S. Oluwafemi, and J. Wu, "Introduction to nanomaterials: synthesis and applications," in Nanomaterials for Solar Cell Applications, Elsevier, pp. 75-95, 2019.

[128] H. Aoki, H. Miyoshi, and Y. Yamagata, "Electrospinning of gelatin nanofiber scaffolds with mild neutral cosolvents for use in tissue engineering," Polymer Journal, vol. 47, pp. 267-277, 2015.

[129] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, and Y. Xia, "Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications," Chemical reviews, vol. 119, pp. 5298-5415, 2019.

[130] A. Haider, S. Haider, and I.-K. Kang, "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology," Arabian Journal of Chemistry, vol. 11, pp. 1165-1188, 2018.

[131] Z. Rezvani, J. R. Venugopal, A. M. Urbanska, D. K. Mills, S. Ramakrishna, and M. Mozafari, "A bird's eye view on the use of electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering: Current state-of-the-art, emerging directions and future trends," Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, vol. 12, pp. 2181-2200, 2016.

[132] A. Yadegari, F. Fahimipour, M. Rasoulianboroujeni, E. Dashtimoghadarm, M. Omidi, H. Golzar, et al., "Specific considerations in scaffold design for oral tissue engineering," in Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering, ed: Elsevier, 2017, pp. 157-183.

[133] A.-M. Haaparanta, "Highly Porous Freeze-Dried Composite Scaffolds for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering," Tampereen teknillinen yliopisto. Julkaisu-Tampere University of Technology. Publication; 1290, 2015.

[134] M. Soltani, M. Yousefpour, and Z. Taherian, "Porous fluorhydroxyapatite-magnesium-gelatin novel composite scaffold based on freeze-drying mechanism for bone tissue engineering application," Materials Letters, vol. 244, pp. 195-198, 2019.

[135] Z. Shahbazarab, A. Teimouri, A. N. Chermahini, and M. Azadi, "Fabrication and characterization of nanobiocomposite scaffold of zein/chitosan/nanohydroxyapatite prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering," International journal of biological macromolecules, vol. 108, pp. 1017-1027, 2018.

[136] C. M. Murphy, M. G. Haugh, and F. J. O'brien, "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering," Biomaterials, vol. 31, pp. 461-466, 2010.

[137] M. Alizadeh, F. Abbasi, A. Khoshfetrat, and H. Ghaleh, "Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method," Materials Science and Engineering: C, vol. 33, pp. 3958-3967, 2013.

[138] P. Habibovic, H. Yuan, C. M. van der Valk, G. Meijer, C. A. van Blitterswijk, and K. de Groot, "3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials," Biomaterials, vol. 26, pp. 3565-3575, 2005.

[139] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," Biomaterials, vol. 26, pp. 5474-5491, 2005.

[140] G. Akay, M. Birch, and M. Bokhari, "Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro," Biomaterials, vol. 25, pp. 3991-4000, 2004.

[141] P. Friedl and E.-B. Bröcker, "The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix," Cellular and molecular life sciences CMLS, vol. 57, pp. 41-64, 2000.

[142] P. Ginestra, "Cell Bioprinting: The 3D-Bioplotter™ Case," Materials (Basel, Switzerland), vol. 12, 2019.

[143] K. Wang, C. Ho, C. Zhang, and B. Wang, "A review on the 3D printing of functional structures for medical phantoms and regenerated tissue and organ applications. Engineering. 2017; 3: 653–662. doi: 10.1016," J. ENG, vol. 13, 2017.

[144] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, et al., "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering," Bioactive materials, vol. 3, pp. 278-314, 2018.

[145] D.-J. Yoo, "Recent trends and challenges in computer-aided design of additive manufacturing-based biomimetic scaffolds and bioartificial organs," International journal of precision engineering and manufacturing, vol. 15, pp. 2205-2217, 2014.

[146] D. Donati, C. Zolezzi, P. Tomba, and A. Viganò, "Bone grafting: historical and conceptual review, starting with an old manuscript by Vittorio Putti," Acta orthopaedica, vol. 78, pp. 19-25, 2007.

[147] M. R. Urist, B. T. O'Connor, and R. G. Burwell, Bone grafts, derivatives, and substitutes: Butterworth-Heinemann, 1994.

[148] C. J. Damien and J. R. Parsons, "Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications," Journal of Applied Biomaterials, vol. 2, pp. 187-208, 1991.

[149] A. Şimşek, G. Çakmak, and E. Cila, "Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler," Totbid Dergisi, vol. 3, pp. 1-11, 2004.

[150] P. Kumar, B. Vinitha, and G. Fathima, "Bone grafts in dentistry," Journal of pharmacy & bioallied sciences, vol. 5, p. S125, 2013.

[151] S. Titsinides, G. Agrogiannis, and T. Karatzas, "Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review," Japanese Dental Science Review, vol. 55, pp. 26-32, 2019.

[152] S. D. Boden and J. H. Schimandle, "Biologic enhancement of spinal fusion," Spine, vol. 20, pp. 113S-123S, 1995.

[153] J. Lilja, "Alveolar bone grafting," Indian Journal of Plastic Surgery, vol. 42, pp. S110-S115, 2009.

[154] D. A. Essig, C. P. Miller, and J. N. Grauer, "The Role for Biologics in the Aging Spine," The Comprehensive Treatment of the Aging Spine E-Book: Minimally Invasive and Advanced Techniques-Expert Consult, p. 384, 2010.

[155] M. D'Souza, N. A. Macdonald, J. L. Gendreau, P. J. Duddleston, A. Y. Feng, and A. L. Ho, "Graft Materials and Biologics for Spinal Interbody Fusion," Biomedicines, vol. 7, p. 75, 2019.

[156] R. K. Leighton, M. Bhandari, T. A. Russell, And K. Trask, "Are Bone Substitutes Useful in the Treatment and Prevention of Nonunions and in the Management of Subchondral Voids?," in Evidence-Based Orthopaedics, Elsevier, 2009, pp. 342-348.

[157] C. Weiss and A. Weiss, Principles and practice of implant dentistry: Mosby Incorporated, 2001.

[158] A. D. Mazzocca and A. Lindsay, Biologics in Orthopaedic Surgery: Elsevier Health Sciences, 2018.

[159] H. S. Sandhu and S. D. Boden, "Biologic enhancement of spinal fusion," Orthopedic Clinics, vol. 29, pp. 621-631, 1998.

[160] A. S. Herford, E. Stoffella, and C. M. Stanford, "Bone grafts and bone substitute materials," in Principles and Practice of Single Implant and Restorations, Elsevier, pp. 75-86, 2014.

[161] J. A. Fishman and C. Patience, "Xenotransplantation: infectious risk revisited," American Journal of Transplantation, vol. 4, pp. 1383-1390, 2004.

[162] H.-S. Sohn and J.-K. Oh, "Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries," Biomaterials research, vol. 23, pp. 1-7, 2019.

[163] M. Bohner, "Resorbable biomaterials as bone graft substitutes," Materials Today, vol. 13, pp. 24-30, 2010.

[164] E. M. Van Lieshout, G. H. Van Kralingen, Y. El-Massoudi, H. Weinans, and P. Patka, "Microstructure and biomechanical characteristics of bone substitutes for trauma and orthopaedic surgery," BMC musculoskeletal disorders, vol. 12, p. 34, 2011.

[165] R. D. Bowles and L. A. Setton, "Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair," Biomaterials, vol. 129, pp. 54-67, 2017.

[166] W. R. Moore, S. E. Graves, and G. I. Bain, "Synthetic bone graft substitutes," ANZ journal of surgery, vol. 71, pp. 354-361, 2001.

[167] J. R. Jones, "Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," Acta biomaterialia, vol. 23, pp. S53-S82, 2015.

[168] W. Cao and L. L. Hench, "Bioactive materials," Ceramics international, vol. 22, pp. 493-507, 1996.

[169] L. L. Hench, "Chronology of bioactive glass development and clinical applications," 2013.

[170] Y.-Z. Huang, H.-Q. Xie, and X. Li, "Scaffolds in bone tissue engineering: Research progress and current applications," 2020.

[171] X. Liu, Z. Xie, C. Zhang, H. Pan, M. N. Rahaman, X. Zhang, et al., "Bioactive borate glass scaffolds: in vitro and in vivo evaluation for use as a drug delivery system in the treatment of bone infection," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 21, pp. 575-582, 2010.

[172] S. M. Carvalho, C. D. Moreira, A. C. X. Oliveira, A. A. Oliveira, E. M. Lemos, and M. M. Pereira, "Bioactive glass nanoparticles for periodontal regeneration and applications in dentistry," in Nanobiomaterials in Clinical Dentistry, Elsevier, pp. 351-383, 2019.

[173] L. L. Hench and J. Wilson, "Surface-active biomaterials," Science, vol. 226, pp. 630-636, 1984.

[174] A. D. Wilson and B. Kent, "The glass-ionomer cement, a new translucent dental filling material," Journal of Applied Chemistry and Biotechnology, vol. 21, pp. 313-313, 1971.

[175] L. A. Salata, C. E. Sverzut, and S. P. Xavier, "Recent advances in the use of glass ionomers: bone substitutes," Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo, vol. 13, pp. 203-207, 1999.

[176] S. Cho and A. C. Cheng, "A review of glass ionomer restorations in the primary dentition," Journal-Canadian Dental Association, vol. 65, pp. 491-495, 1999.

[177] C. C. Camilo, C. Fortulan, N. Parizotto, and B. de M Purquerio, "Porous alumina scaffolds with bioactive coating: Implants in the rat tibia and in vitro studies," in Key Engineering Materials, pp. 699-702, 2009.

[178] C. Büsing, B. d'Hoedt, W. Schulte, and G. Heimke, "Morphological demonstration of direct deposition of bone on human aluminium oxide ceramic dental implants," Biomaterials, vol. 4, pp. 125-127, 1983.

[179] X. He, Y. Zhang, J. Mansell, and B. Su, "Zirconia toughened alumina ceramic foams for potential bone graft applications: fabrication, bioactivation, and cellular responses," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 19, pp. 2743-2749, 2008.

[180] Y. Kumar, K. Nalini, J. Menon, D. K. Patro, and B. Banerji, "Calcium sulfate as bone graft substitute in the treatment of osseous bone defects, a prospective study," Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, vol. 7, p. 2926, 2013.

[181] C. M. Kelly, R. M. Wilkins, S. Gitelis, C. Hartjen, J. T. Watson, and P. T. Kim, "The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial," Clinical Orthopaedics and Related Research®, vol. 382, pp. 42-50, 2001.

[182] E. P. Favvas, K. L. Stefanopoulos, N. C. Vordos, G. I. Drosos, and A. C. Mitropoulos, "Structural characterization of calcium sulfate bone graft substitute cements," Materials Research, vol. 19, pp. 1108-1113, 2016.

[183] S. Parikh, "Bone graft substitutes: past, present, future," Journal of postgraduate medicine, vol. 48, p. 142, 2002.

[184] S. OVERGAARD, "Degradation of calcium phosphate coatings and bone substitutes," in Cellular Response to Biomaterials, Elsevier, pp. 560-571, 2009.

[185] I. M. Mehdawi and A. Young, "Antibacterial composite restorative materials for dental applications," in Non-Metallic Biomaterials for Tooth Repair and Replacement, ed: Elsevier, pp. 270-293, 2013.

[186] H. Yuan and K. de Groot, "Calcium phosphate biomaterials: an overview," in Learning from Nature How to Design New Implantable Biomaterialsis: From Biomineralization Fundamentals to Biomimetic Materials and Processing Routes, ed: Springer, pp. 37-57, 2004.

[187] A. M. A. Bakheet, M. A. Saeed, A. R. B. M. Isa, and R. Sahnoun, "First principles study of the physical properties of pure and doped calcium phosphate biomaterial for tissue engineering," in Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering, ed: Elsevier, pp. 215-240, 2016.

[188] R. Khairnar, V. Narwade, and V. Kokol, "Nanostructured bioceramics and applications," Fundamental Biomaterials: Ceramics, p. 251, 2018.

[189] A. Hadzovic, Solutions Manual to Accompany Inorganic Chemistry 7th Edition: Oxford University Press, 2018.

[190] R. Z. LeGeros and J. P. LeGeros, "Dense hydroxyapatite," in An introduction to bioceramics, ed: World Scientific, pp. 139-180, 1993.

[191] S. Anil, E. P. Chalisserry, S. Y. Nam, and J. Venkatesan, "Biomaterials for craniofacial tissue engineering and regenerative dentistry," in Advanced Dental Biomaterials, ed: Elsevier, pp. 643-674, 2019.

[192] W. Jiang and H. Liu, "Nanocomposites for bone repair and osteointegration with soft tissues," in Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration, Elsevier, pp. 241-257, 2016.

[193] C. Durucan and P. Brown, "α-Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 11, pp. 365-371, 2000.

[194] M. Cohn, A. Unnanuntana, T. Pannu, S. Warner, and J. Lane, "7.16 Materials in Fracture Fixation," 2017.

[195] R. G. Carrodeguas and S. De Aza, "α-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications," Acta biomaterialia, vol. 7, pp. 3536-3546, 2011.

[196] T. Goto and H. Katsui, "Chemical vapor deposition of Ca–P–O film coating," in Interface Oral Health Science 2014, Springer, Tokyo, pp. 103-115, 2015.

[197] H. Chaair, H. Labjar, and O. Britel, "Synthesis of β-tricalcium phosphate," Morphologie, vol. 101, pp. 120-124, 2017.

[198] E. Boanini, M. Gazzano, C. Nervi, M. R. Chierotti, K. Rubini, R. Gobetto, et al., "Strontium and zinc substitution in β-tricalcium phosphate: an X-ray diffraction, solid state NMR and ATR-FTIR study," Journal of functional biomaterials, vol. 10, p. 20, 2019.

[199] T. van Vugt, J. Geurts, J. Arts, and N. Lindfors, "Biomaterials in treatment of orthopedic infections," in Management of periprosthetic joint infections (PJIs), ed: Elsevier, pp. 41-68, 2017.

[200] H. Chung, S. Kim, and S. H. Chung, "Clinical Outcome of Beta-Tricalcium Phosphate Use for Bone Defects after Operative Treatment of Benign Tumors," Clinics in orthopedic surgery, vol. 11, pp. 233-236, 2019.

[201] P. Gao, H. Zhang, Y. Liu, B. Fan, X. Li, X. Xiao, et al., "Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo," Scientific reports, vol. 6, pp. 1-14, 2016.

[202] G. Fernandez de Grado, L. Keller, Y. Idoux-Gillet, Q. Wagner, A.-M. Musset, N. Benkirane-Jessel, et al., "Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management," Journal of tissue engineering, vol. 9, p. 2041731418776819, 2018.

[203] P. Hernigou, A. Dubory, J. Pariat, D. Potage, F. Roubineau, S. Jammal, et al., "Beta-tricalcium phosphate for orthopedic reconstructions as an alternative to autogenous bone graft," Morphologie, vol. 101, pp. 173-179, 2017.

[204] H. Liu, H. Yazici, C. Ergun, T. J. Webster, and H. Bermek, "An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration," Acta biomaterialia, vol. 4, pp. 1472-1479, 2008.

[205] J. Lu, M. Descamps, J. Dejou, G. Koubi, P. Hardouin, J. Lemaitre, et al., "The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone," Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, vol. 63, pp. 408-412, 2002.

[206] A.-M. Yousefi, "A review of calcium phosphate cements and acrylic bone cements as injectable materials for bone repair and implant fixation," Journal of applied biomaterials & functional materials, vol. 17, 2019.

[207] B. Yu, Y. Zhang, X. Li, Q. Wang, Y. Ouyang, Y. Xia, et al., "The use of injectable chitosan/nanohydroxyapatite/collagen composites with bone marrow mesenchymal stem cells to promote ectopic bone formation in vivo," Journal of Nanomaterials, vol. 2013, 2013.

[208] G. Wang, Z. Lu, and H. Zreiqat, "Bioceramics for skeletal bone regeneration," in Bone substitute biomaterials, Elsevier, pp. 180-216, 2014.

[209] A. El-Ghannam and C. Ning, "Effect of bioactive ceramic dissolution on the mechanism of bone mineralization and guided tissue growth in vitro," Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, vol. 76, pp. 386-397, 2006.

[210] P. Ducheyne, Comprehensive biomaterials vol. 1: Elsevier, 2015.

[211] L. Galois, D. Mainard, and J. Delagoutte, "Beta-tricalcium phosphate ceramic as a bone substitute in orthopaedic surgery," International orthopaedics, vol. 26, pp. 109-115, 2002.

[212] W. Zhu, Q. Ma, S. Borg, C. Ö. Mägi, X. Weng, H. Engqvist, et al., "Cemented injectable multi-phased porous bone grafts for the treatment of femoral head necrosis," Journal of Materials Chemistry B, vol. 7, pp. 2997-3006, 2019.

[213] W. Wang and K. W. Yeung, "Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review," Bioactive materials, vol. 2, pp. 224-247, 2017.

[214] C. W. Schlickewei, G. Laaff, A. Andresen, T. O. Klatte, J. M. Rueger, J. Ruesing, et al., "Bone augmentation using a new injectable bone graft substitute by combining calcium phosphate and bisphosphonate as composite-an animal model," Journal of orthopaedic surgery and research, vol. 10, p. 116, 2015.

[215] J. T. Watson, "The use of an injectable bone graft substitute in tibial metaphyseal fractures," Orthopedics, vol. 27, pp. S103-S107, 2004.

[216] S. Larsson and G. Hannink, "Injectable bone-graft substitutes: current products, their characteristics and indications, and new developments," Injury, vol. 42, pp. S30-S34, 2011.

[217] J. S. Carson and M. P. Bostrom, "Synthetic bone scaffolds and fracture repair," Injury, vol. 38, pp. S33-S37, 2007.

[218] Y. He, J. Gao, X. Li, Z. Ma, Y. Zhang, M. Li, et al., "Fabrication of injectable calcium sulfate bone graft material," Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, vol. 21, pp. 1313-1330, 2010.

[219] J. Wironen, "Injectable porous bone graft materials," Google Patents, 2002.

[220] X. Wang, L. Chen, H. Xiang, and J. Ye, "Influence of anti-washout agents on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate cement," Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, vol. 81, pp. 410-418, 2007.

[221] R. A. Perez, H.-W. Kim, and M.-P. Ginebra, "Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate cements," Journal of tissue engineering, vol. 3, p. 2041731412439555, 2012.

[222] P. Zhai, X. Peng, B. Li, Y. Liu, H. Sun, and X. Li, "The Application of Hyaluronic Acid in Bone Regeneration," International journal of biological macromolecules, 2019.

[223] M. A. Emine Afra Demirci, Ozan Karaman, "Enjekte Edilebilir Kemik Greftlerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu," TIPTEKNO'17, pp. 149-151, 2017.

[224] T. Arahira, M. Maruta, and S. Matsuya, "Characterization and in vitro evaluation of biphasic α-tricalcium phosphate/β-tricalcium phosphate cement," Materials Science and Engineering: C, vol. 74, pp. 478-484, 2017.

[225] A. E. Ofluoglu, U. Erdogan, M. Aydogan, O. M. Cevik, and O. Ofluoglu, "Anterior cervical fusion with interbody cage containing beta-tricalcium phosphate: Clinical and radiological results," Acta orthopaedica et traumatologica turcica, vol. 51, pp. 197-200, 2017.

[226] K. H. Włodarski, P. K. Włodarski, and R. Galus, "Bioactive composites for bone regeneration. Review," Ortopedia, traumatologia, rehabilitacja, vol. 10, pp. 201-210, 2008.

[227] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Alginate: properties and biomedical applications," Progress in polymer science, vol. 37, pp. 106-126, 2012.

[228] E. Varoni, M. Tschon, B. Palazzo, P. Nitti, L. Martini, and L. Rimondini, "Agarose gel as biomaterial or scaffold for implantation surgery: characterization, histological and histomorphometric study on soft tissue response," Connective tissue research, vol. 53, pp. 548-554, 2012.

[229] A. Aguilar, N. Zein, E. Harmouch, B. Hafdi, F. Bornert, D. Offner, et al., "Application of chitosan in bone and dental engineering," Molecules, vol. 24, p. 3009, 2019.

[230] E. Salamanca, C. C. Hsu, W. L. Yao, C. S. Choy, Y. H. Pan, N.-C. Teng, et al., "Porcine Collagen–Bone Composite Induced Osteoblast Differentiation and Bone Regeneration In Vitro and In Vivo," Polymers, vol. 12, p. 93, 2020.

[231] L. E. Niklason, "Understanding the extracellular matrix to enhance stem cell-based tissue regeneration," Cell stem cell, vol. 22, pp. 302-305, 2018.

[232] J. Kuo and G. Prestwich, "Comprehensive biomaterials," Elsevier, vol. 2, pp. 239-259, 2011.

[233] H. J. Faust, Q. Guo, and J. H. Elisseeff, "Cartilage Tissue Engineering," in Principles of Regenerative Medicine, Elsevier, pp. 937-952, 2019.

[234] M. D. Godesky and D. I. Shreiber, "Hyaluronic acid-based hydrogels with independently tunable mechanical and bioactive signaling features," Biointerphases, vol. 14, p. 061005, 2019.

[235] L. D. Weiss, Easy injections: Elsevier Health Sciences, 2007.

[236] H. G. Garg and C. A. Hales, Chemistry and biology of hyaluronan: Elsevier, 2004.

[237] H. Tan, Y. Gong, L. Lao, Z. Mao, and C. Gao, "Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 18, pp. 1961-1968, 2007.

[238] L. Huang, Y. Cheng, P. Koo, K. Lee, L. Qin, J. Cheng, et al., "The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures," Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, vol. 66, pp. 880-884, 2003.

[239] E. Martínez-Sanz, D. A. Ossipov, J. Hilborn, S. Larsson, K. B. Jonsson, and O. P. Varghese, "Bone reservoir: injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation," Journal of controlled release, vol. 152, pp. 232-240, 2011.

[240] M. Alkhraisat, C. Rueda, F. Marino, J. Torres, L. Jerez, U. Gbureck, et al., "The effect of hyaluronic acid on brushite cement cohesion," Acta biomaterialia, vol. 5, pp. 3150-3156, 2009.

[241] J. Bosco, A. Fatimi, S. Quillard, J. M. Bouler, and P. Weiss, "Rheological properties of an injectable bioactive calcium phosphate material," in Key Engineering Materials, pp. 847-850, 2007.

[242] J. A. Cole, M. E. Carroll, J. P. Moseley, and K. C. Richelsoph, "Injectable resorbable bone graft material, powder for forming same and methods relating thereto for treating bone defects", Google Patents, 2009.

[243] A. Fatimi, J.-F. Tassin, M. A. Axelos, and P. Weiss, "The stability mechanisms of an injectable calcium phosphate ceramic suspension," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 21, pp. 1799-1809, 2010.

[244] R. O'Neill, H. McCarthy, E. Montufar, M.-P. Ginebra, D. I. Wilson, A. Lennon, et al., "Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements," Acta biomaterialia, vol. 50, pp. 1-19, 2017.

[245] G. Najafpour, Biochemical engineering and biotechnology: Elsevier, 2015.

[246] Y.-Y. Hu, A. Rawal, and K. Schmidt-Rohr, "Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone," Proceedings of the national academy of sciences, vol. 107, pp. 22425-22429, 2010.

[247] C. Ma, E. Gerhard, D. Lu, and J. Yang, "Citrate chemistry and biology for biomaterials design," Biomaterials, vol. 178, pp. 383-400, 2018.

[248] K. Kobayashi, T. Hattori, Y. Honda, and K. Kirimura, "Oxalic acid production by citric acid-producing Aspergillus niger overexpressing the oxaloacetate hydrolase gene oahA," Journal of industrial microbiology & biotechnology, vol. 41, pp. 749-756, 2014.

[249] E. Olsson, "Effects of citric acid on starch-based barrier coatings," Karlstads universitet, 2013.

[250] H. Shi, W. Zhang, X. Liu, S. Zeng, T. Yu, and C. Zhou, "Synergistic effects of citric acid-sodium alginate on physicochemical properties of α-tricalcium phosphate bone cement," Ceramics International, vol. 45, pp. 2146-2152, 2019.

[251] S. Sarda, E. Fernandez, M. Nilsson, M. Balcells, and J. Planell, "Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent," Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, vol. 61, pp. 653-659, 2002.

[252] E. Fortunati, J. M. Kenny, and L. Torre, "Lignocellulosic materials as reinforcements in sustainable packaging systems: processing, properties, and applications," in Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy, Elsevier, pp. 87-102, 2019.

[253] J. George and S. Sabapathi, "Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications," Nanotechnology, science and applications, vol. 8, p. 45, 2015.

[254] A. Gumrah Dumanli, "Nanocellulose and its composites for biomedical applications," Current Medicinal Chemistry, vol. 24, pp. 512-528, 2017.

[255] E. Fortunato, D. Gaspar, P. Duarte, L. Pereira, H. Águas, A. Vicente, et al., "Optoelectronic devices from bacterial nanocellulose," in Bacterial Nanocellulose, ed: Elsevier, pp. 179-197, 2016.

[256] M. Ramos, A. Valdés, and M. Garrigós, "Multifunctional applications of nanocellulose-based nanocomposites," in Multifunctional Polymeric Nanocomposites Based on Cellulosic Reinforcements, ed: Elsevier, pp. 177-204, 2016.

[257] L. Hao, S. Sapuan, M. Hassan, and R. Sheltami, "Natural fiber reinforced vinyl polymer composites," in Natural Fibre Reinforced Vinyl Ester and Vinyl Polymer Composites, Elsevier, pp. 27-70, 2018.

[258] D. A. Osorio, B. E. Lee, J. M. Kwiecien, X. Wang, I. Shahid, A. L. Hurley, et al., "Cross-linked Cellulose Nanocrystal Aerogels as Viable Bone Tissue Scaffolds," Acta biomaterialia, 2019.

[259] E. Lam, K. B. Male, J. H. Chong, A. C. Leung, and J. H. Luong, "Applications of functionalized and nanoparticle-modified nanocrystalline cellulose," Trends in biotechnology, vol. 30, pp. 283-290, 2012.

[260] R. M. Domingues, M. Silva, P. Gershovich, S. Betta, P. Babo, S. G. Caridade, et al., "Development of injectable hyaluronic acid/cellulose nanocrystals bionanocomposite hydrogels for tissue engineering applications," Bioconjugate chemistry, vol. 26, pp. 1571-1581, 2015.

[261] C. Miao and W. Y. Hamad, "Cellulose reinforced polymer composites and nanocomposites: a critical review," Cellulose, vol. 20, pp. 2221-2262, 2013.

[262] R. M. A. Domingues, M. L. S. D. A. Silva, P. Gershovich, S. Betta, P. M. S. Babo, S. G. F. Caridade, et al., "Injectable hyaluronic acid bionanocomposite hydrogels: from biomaterial development to biological performance outcomes," 2016.

[263] Y. Li, H. Zhu, F. Shen, J. Wan, S. Lacey, Z. Fang, et al., "Nanocellulose as green dispersant for two-dimensional energy materials," Nano energy, vol. 13, pp. 346-354, 2015.

[264] O. Acarturk, M. Lehmicke, H. Aberman, D. Toms, J. O. Hollinger, and M. Fulmer, "Bone healing response to an injectable calcium phosphate cement with enhanced radiopacity," Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, vol. 86, pp. 56-62, 2008.

[265] J. Åberg, H. B. Henriksson, H. Engqvist, A. Palmquist, C. Brantsing, A. Lindahl, et al., "Biocompatibility and resorption of a radiopaque premixed calcium phosphate cement," Journal of Biomedical Materials Research Part A, vol. 100, pp. 1269-1278, 2012.

[266] V. M. Ochoa-Rodríguez, M. Tanomaru-Filho, E. M. Rodrigues, J. M. Guerreiro-Tanomaru, R. Spin-Neto, and G. Faria, "Addition of zirconium oxide to Biodentine increases radiopacity and does not alter its physicochemical and biological properties," Journal of Applied Oral Science, vol. 27, 2019.

[267] C. Piconi and G. Maccauro, "Zirconia as a ceramic biomaterial," Biomaterials, vol. 20, pp. 1-25, 1999.

[268] A. Sabokbar, N. A. Athanasou, and D. W. Murray, "Osteolysis induced by radio-opaque agents," in Bone Cements and Cementing Technique, ed: Springer, 2001, pp. 149-161.

[269] W. I. Abdel-Fattah, F. M. Reicha, and T. A. Elkhooly, "Nano-beta-tricalcium phosphates synthesis and biodegradation: 1. Effect of microwave and SO42− ions on β-TCP synthesis and its characterization," Biomedical Materials, vol. 3, p. 034121, 2008.

[270] W.-J. Shih, Y.-F. Chen, M.-C. Wang, and M.-H. Hon, "Crystal growth and morphology of the nano-sized hydroxyapatite powders synthesized from CaHPO4· 2H2O and CaCO3 by hydrolysis method," Journal of Crystal Growth, vol. 270, pp. 211-218, 2004.

[271] J. Chen, Y. Wang, X. Chen, L. Ren, C. Lai, W. He, et al., "A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders," Materials Letters, vol. 65, pp. 1923-1926, 2011.

[272] M. Yoshimura, H. Suda, K. Okamoto, and K. Ioku, "Hydrothermal synthesis of biocompatible whiskers," Journal of materials science, vol. 29, pp. 3399-3402, 1994.

[273] A. C. Tas, "Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 C in synthetic body fluids," Biomaterials, vol. 21, pp. 1429-1438, 2000.

[274] A. Siddharthan, S. Seshadri, and T. S. Kumar, "Rapid synthesis of calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles by microwave irradiation," Trends Biomater Artif Organs, vol. 18, pp. 110-113, 2005.

[275] L. Liu, Y. Wu, C. Xu, S. Yu, X. Wu, and H. Dai, "Synthesis, characterization of nano-β-tricalcium phosphate and the inhibition on hepatocellular carcinoma cells," Journal of Nanomaterials, vol. 2018, 2018.

[276] M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, and A. Jamshidi, "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures," Acta biomaterialia, vol. 9, pp. 7591-7621, 2013.

[277] M. C. Chang, "Use of wet chemical method to prepare β tri-calcium phosphates having macro-and nano-crystallites for artificial bone," Journal of the Korean Ceramic Society, vol. 53, pp. 670-675, 2016.

[278] Ö. Y. Baştan F.E, "Producing antibacterial silver-doped Hydroxyapatite powders with chemical precipitation and reshaping in a spray dryer," Materiali in tehnologije, vol. 47, pp. 431-434, 2013.

[279] F. Bakan, "A Systematic Study of the Effect of pH on the Initialization of Ca-deficient Hydroxyapatite to β-TCP Nanoparticles," Materials, vol. 12, p. 354, 2019.

[280] H. Qiu, L. Gao, C. Feng, J. Guo, and D. Yan, "Preparation and characterization of nanoscale Y-TZP powder by heterogeneous azeotropic distillation," Journal of materials science, vol. 30, pp. 5508-5513, 1995.

[281] S. Chiangka, S. Watcharamaisakul, and B. Golman, "Effect of slurry formulation on morphology and flowability of spray-dried alumina/zirconia composite particles," in Key Engineering Materials, pp. 531-534, 2016.

[282] H. Keramati, M. H. Saidi, and M. Zabetian, "Stabilization of the suspension of zirconia microparticle using the nanoparticle halos mechanism: zeta potential effect," Journal of Dispersion Science and Technology, vol. 37, pp. 6-13, 2016.

[283] N. K. Dehkordi, M. Minaiyan, A. Talebi, V. Akbari, and A. Taheri, "Nanocrystalline cellulose–hyaluronic acid composite enriched with GM-CSF loaded chitosan nanoparticles for enhanced wound healing," Biomedical Materials, vol. 14, p. 035003, 2019.

[284] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, et al., "Impact of particle size and polydispersity index on the

clinical applications of lipidic nanocarrier systems," Pharmaceutics, vol. 10, p. 57, 2018.

[285] S. Milne and H. Mostaghaci, "The influence of different drying conditions on powder properties and processing characteristics," Materials Science and Engineering: A, vol. 130, pp. 263-271, 1990.

[286] I. Rahman, P. Vejayakumaran, C. Sipaut, J. Ismail, and C. Chee, "Effect of the drying techniques on the morphology of silica nanoparticles synthesized via sol–gel process," Ceramics International, vol. 34, pp. 2059-2066, 2008.

[287] M. Maghsoodi and Z. Yari, "Effect of drying phase on the agglomerates prepared by spherical crystallization," Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, vol. 14, p. 51, 2015.

[288] M. Sameti, G. Bohr, M. R. Kumar, C. Kneuer, U. Bakowsky, M. Nacken, et al., "Stabilisation by freeze-drying of cationically modified silica nanoparticles for gene delivery," International journal of pharmaceutics, vol. 266, pp. 51-60, 2003.

[289] M. M. Nor, M. A. Hanan, Z. Zamal, N. Daud, Z. Tapsir, and S. Saidin, "Synthesis of Tricalcium Phosphate at Different pH Condition," Journal of Advanced Research in Materials Science, vol. 13, pp. 11-15.

[290] D. Xidaki, P. Agrafioti, D. Diomatari, A. Kaminari, E. Tsalavoutas-Psarras, P. Alexiou, et al., "Synthesis of hydroxyapatite, β-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate particles to act as local delivery carriers of curcumin: loading, release and in vitro studies," Materials, vol. 11, p. 595, 2018.

[291] S. Gallinetti, C. Canal, and M. P. Ginebra, "Development and characterization of biphasic hydroxyapatite/β-TCP cements," Journal of the American Ceramic Society, vol. 97, pp. 1065-1073, 2014.

[292] C. Ruiz-Aguilar, U. Olivares-Pinto, E. A. Aguilar-Reyes, R. López-Juárez, and I. Alfonso, "Characterization of β-tricalcium phosphate powders synthesized by sol–gel and mechanosynthesis," Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, vol. 57, pp. 213-220, 2018.

[293] R. Serzane, J. Locs, L. Berzina-Cimdina, and R. Sadretdinovs, "Development of porous ceramics by lycopodium using uniaxial pressing and sintering," Processing and Application of Ceramics, vol. 4, pp. 231-235, 2010.

[294] D. d. S. Tavares, L. d. O. Castro, G. D. d. A. Soares, G. G. Alves, and J. M. Granjeiro, "Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β-tricalcium phosphate," Journal of Applied Oral Science, vol. 21, pp. 37-42, 2013.

[295] T. Windarti, A. Haris, Y. Astuti, and A. Darmawan, "Synthesis of β-Calcium Pyrophosphate by sol-gel method," in IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, p. 12-58, 2017.

[296] M. R. Gauna, M. S. Conconi, S. Gómez, G. Suárez, E. F. Aglietti, and N. M. Rendtorff Birrer, "Monoclinic-tetragonal zirconia quantification of commercial nanopowder mixtures by XRD and DTA," 2015.

[297] V. Thakare, P. Joshi, R. Godse, V. Bhatkar, P. Wadegaokar, and S. Omanwar, "Evaluation of biological activities of nanocrystalline tetragonal zirconia synthesized via sol-gel method," Int. J. Pharm. Pharm. Sci, vol. 8, pp. 125-131, 2016.

[298] O. Mangla and S. Roy, "Monoclinic zirconium oxide nanostructures having tunable band gap synthesized under extremely non-equilibrium plasma conditions," in Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings, p. 10, 2018.

[299] M. R. Gauna, M. S. Conconi, S. Gómez, G. Suárez, E. F. Aglietti, and N. M. Rendtorff Birrer, "Monoclinic-tetragonal zirconia quantification of commercial nanopowder mixtures by XRD and DTA," Ceramics-Silikáty, vol. 59, 2015.

[300] B. L. G. Santoni, L. Niggli, G. Sblendorio, D. Alexander, C. Stähli, P. Bowen, et al., "Chemically pure β-tricalcium phosphate powders: Evidence of two crystal structures," Journal of the European Ceramic Society, vol. 41, pp. 1683-1694, 2021.

[301] A. Massit, B. Idrissi, and K. Yamni, "Synthesis and characterization of nano-sized β-tricalcium phosphate: effects of the aging time," IOSR Journal of Applied Chemistry, vol. 7, pp. 57-61, 2014.

[302] A. Stunda-Zujeva, Z. Irbe, and L. Berzina-Cimdina, "Controlling the morphology of ceramic and composite powders obtained via spray drying–a review," Ceramics International, vol. 43, pp. 11543-11551, 2017.

[303] X. Zhang, P. Sun, T. Yan, Y. Huang, Z. Ma, B. Zou, et al., "Water's phase diagram: from the notion of thermodynamics to hydrogen-bond cooperativity," Progress in Solid State Chemistry, vol. 43, pp. 71-81, 2015.

[304] R. F. Weska, W. C. Vieira Jr, G. M. Nogueira, and M. M. Beppu, "Effect of freezing methods on the properties of lyophilized porous silk fibroin membranes," Materials Research, vol. 12, pp. 233-237, 2009.

[305] M. A. Ghalia and Y. Dahman, "Advanced nanobiomaterials in tissue engineering: Synthesis, properties, and applications," in Nanobiomaterials in soft tissue engineering, ed: Elsevier, pp. 141-172, 2016.

[306] A. Santiago and R. Moreira, "Drying of edible seaweeds," in Sustainable seaweed technologies, Elsevier, pp. 131-154, 2020.

[307] T. Fu, R. J. Moon, P. Zavattieri, J. Youngblood, and W. J. Weiss, "Cellulose nanomaterials as additives for cementitious materials," in Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites, ed: Elsevier, pp. 455-482, 2017.

[308] J. Paternina, "Preventing moisture caking, the unwanted agglomeration," Powder and Bulk Engineering Magazine, 2014.

[309] J. Shanthi and S. Vijayalakshmi, "Microcontroller Based Rotary Evaporator for Solution Growth," Asian J. of Adv. Basic Sci, vol. 3, pp. 89-93, 2014.

[310] U. Inyang, I. Oboh, and B. Etuk, "Drying and the different techniques," International Journal of Food Nutrition and Safety, vol. 8, pp. 45-72, 2017.

[311] S. N. Kłodzińska and H. M. Nielsen, "Hyaluronic acid-based nanosystems for drug delivery applications," in Biopolymer-Based Nanomaterials in Drug Delivery and Biomedical Applications, Elsevier, pp. 221-250, 2021.

[312] M. S. Arsad, P. M. Lee, and L. K. Hung, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles and β-TCP particles," in 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science, IPCBEE, pp. 184-188, 2011.

[313] L. Berzina-Cimdina and N. Borodajenko, "Research of calcium phosphates using Fourier transform infrared spectroscopy," Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology, vol. 12, pp. 251-263, 2012.

[314] S. Kangkan, T. Pongprayoon, and S. Ummartyotin, "Morphologically controlled synthesis of (β-tricalcium phosphate) β-TCP particles from cuttlebone by sodium dodecyl sulfate (SDS) anionic surfactant: In vitro behavior of mouse osteoblast cells," Journal of Materials Research and Technology, vol. 9, pp. 3121-3127, 2020.

[315] A. Singh and U. T. Nakate, "Microwave synthesis, characterization, and photoluminescence properties of nanocrystalline zirconia," The Scientific World Journal, vol. 2014, 2014.

[316] N. Horti, M. Kamatagi, S. Nataraj, M. Wari, and S. Inamdar, "Structural and optical properties of zirconium oxide (ZrO2) nanoparticles: effect of calcination temperature," Nano Express, vol. 1, 2020.

[317] N. C. S. Selvam, A. Manikandan, L. J. Kennedy, and J. J. Vijaya, "Comparative investigation of zirconium oxide (ZrO2) nano and microstructures for structural, optical and photocatalytic properties," Journal of colloid and interface science, vol. 389, pp. 91-98, 2013.

[318] S. M. Yakout and H. S. Hassan, "Adsorption characteristics of sol gel-derived zirconia for cesium ions from aqueous solutions," Molecules, vol. 19, pp. 9160-9172, 2014.

[319] J. Carneiro, P. M. Döll-Boscardin, B. C. Fiorin, J. M. Nadal, P. V. Farago, and J. P. d. Paula, "Development and characterization of hyaluronic acid-lysine nanoparticles with potential as innovative dermal filling," Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 52, pp. 645-651, 2016.

[320] S. A. de Oliveira, B. C. da Silva, I. C. Riegel-Vidotti, A. Urbano, P. C. de Sousa Faria-Tischer, and C. A. Tischer, "Production and characterization of bacterial

cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb," International journal of biological macromolecules, vol. 97, pp. 642-653, 2017.

[321] Y. Ryabenkova, A. Pinnock, P. Quadros, R. Goodchild, G. Möbus, A. Crawford, et al., "The relationship between particle morphology and rheological properties in injectable nano-hydroxyapatite bone graft substitutes," Materials Science and Engineering: C, vol. 75, pp. 1083-1090, 2017.

[322] A. Fallacara, F. Marchetti, M. Pozzoli, U. R. Citernesi, S. Manfredini, and S. Vertuani, "Formulation and characterization of native and crosslinked hyaluronic acid microspheres for dermal delivery of sodium ascorbyl phosphate: A comparative study," Pharmaceutics, vol. 10, p. 254, 2018.

[323] B. Sarikaya and H. M. Aydin, "Collagen/beta-tricalcium phosphate based synthetic bone grafts via dehydrothermal processing," BioMed research international, vol. 2015, 2015.

[324] K. Benešová, M. Pekař, L. Lapčík, and J. Kučeník, "Stability evaluation of n-alkyl hyaluronic acid derivates by DSC and TG measurement," Journal of thermal analysis and calorimetry, vol. 83, pp. 341-348, 2006.

[325] S. Hesaraki, S. Borhan, A. Zamanian, and M. Hafezi-Ardakani, "Rheological properties and Injectability of β-Tricalcium phosphate-hyaluronic acid/polyethylene glycol composites used for the treatment of Vesicouretheral reflux," Biomed Eng Res, vol. 1, pp. 40-44, 2013.

[326] M. Maheshwar, "A review article on measurement of viscosity," Journal of Research in Pharmacy and Chemistry, vol. 8, pp. 69-77, 2018.

[327] J. Réeff, A. Gaignaux, J. Goole, C. De Vriese, and K. Amighi, "New sustained-release intraarticular gel formulations based on monolein for local treatment of arthritic diseases," Drug development and industrial pharmacy, vol. 39, pp. 1731-1741, 2013.

[328] R. P. King, Introduction to practical fluid flow: Elsevier, 2002.

[329] F. C. Kalkan, "Arıtma çamurlarında reolojik karakterizasyonun belirlenmesi," SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.

[330] J. Sheng, "Chapter 6 Y Polymer Viscoelastic Behavior and Its Effect on Field Facilities and Operations," Modern Chemical Enhanced Oil Recovery, Gulf Professional Publishing, Boston, p. 207-238, 2011.

[331] T. Abbasov And H. Bilgili, "Non-Newtonian Sıvıların Aksiyel Halka Akışında Basınç Kaybının Belirlenmesi için Yeni Bir Çözüm Yaklaşımı," Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Part C: Tasarım ve Teknoloji, vol. 8, pp. 758-767.

[332] G. Beaucage, "Polymer science: a comprehensive reference," 2012.

[333] J. Kim, J.-Y. Chang, Y.-Y. Kim, M.-J. Kim, and H.-S. Kho, "Effects of molecular weight of hyaluronic acid on its viscosity and enzymatic activities of lysozyme and peroxidase," Archives of oral biology, vol. 89, pp. 55-64, 2018.

[334] P. Snetkov, K. Zakharova, S. Morozkina, R. Olekhnovich, and M. Uspenskaya, "Hyaluronic acid: the influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer," Polymers, vol. 12, p. 1800, 2020.

[335] C. Chun, D. Y. Lee, J.-T. Kim, M.-K. Kwon, Y.-Z. Kim, and S.-S. Kim, "Effect of molecular weight of hyaluronic acid (HA) on viscoelasticity and particle texturing feel of HA dermal biphasic fillers," Biomaterials research, vol. 20, pp. 1-7, 2016.

[336] G. K. Srivastava, M. L. Alonso-Alonso, I. Fernandez-Bueno, M. T. Garcia-Gutierrez, F. Rull, J. Medina, et al., "Comparison between direct contact and extract exposure methods for PFO cytotoxicity evaluation," Scientific reports, vol. 8, pp. 1-9, 2018.

[337] O. TOKUR and A. AKSOY, "In vitro sitotoksisite testleri," Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, vol. 6, pp. 112-118, 2017.

[338] J. C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R. W. Horobin, and Á. Villanueva, "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets," Acta histochemica, vol. 114, pp. 785-796, 2012.

[339] A. Bahuguna, I. Khan, V. K. Bajpai, and S. C. Kang, "MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug," Bangladesh Journal of Pharmacology, vol. 12, pp. 115-118, 2017.

[340] K. G. Ozdemir, H. Yılmaz, and S. Yılmaz, "In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay," Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, vol. 90, pp. 82-86, 2009.

[341] I. Standard, "Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity," Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization, 2009.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. **Çalışmanın Adı:** Examiation of citric acid effect on phase stability of bone graft and determination of optimum gel/powder ratios

Kongre Adı-Tarihi: MAS 14th International European Conference On Mathematics, Engineering, Natural&Medical Sciences, Budapest, Macaristan, 26-28 Mart 2021

Tam Metin Bildiri Kitapçığı: ss.259-264

Projeler

1. **Proje Adı:** Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları için Rejeneratif Enjekte Edilebilir Malzeme Üretimi

Proje Türü: Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (YTÜ BAP Koordinatörlüğü)

Proje Kodu: FYL-2020-3834