T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERAMİK ESASLI KOMPOZIT İLE BİYOUYUMLU YAPAY DOKU OLUŞTURULMASI

Mehmet Can ARPAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Malzeme Programı

Danışman

Prof. Dr. Sibel DAĞLILAR

Eş Danışman

Dr.Öğr.Üyesi Cevriye KALKANDELEN

Şubat, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERAMİK ESASLI KOMPOZIT İLE BİYOUYUMLU YAPAY DOKU OLUŞTURULMASI

Mehmet Can ARPAK tarafından hazırlanan tez çalışması 13.02.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, Malzeme Programı YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel DAĞLILAR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Dr.Öğr. Üyesi Cevriye KALKANDELEN
İstanbul Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sibel DAĞLILAR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Nilgün KUŞKONMAZ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ, Üye
Marmara Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Sibel DAĞLILAR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Seramik Esaslı Kompozit ile Biyouyumlu Yapay Doku Oluşturulması" 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.

Mehmet Can ARPAK

İmza

Canım Aileme

TEŞEKKÜR

Üniversite hayatımın ilk anından itibaren beni hayata hazırlayan ve yüksek lisans eğitimimde benimle birlikte çalışmayı kabul edip, bu yolu bana açan pek kıymetli canım öğretmenim Prof. Dr. Sibel DAĞLILAR'a, çalışmalarımın her anında çalışkanlığıyla, yardımlarıyla beni destekleyen kıymetli eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Cevriye KALKANDELEN'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisans Tezi çalışmaları süresince laboratuvar imkanı sağlayan, bilgi ve birimkimlerini eksik etmeyen ve her konuda yardımcı olan sayın hocam Prof Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimde, beni cesaretlendiren kıymetli arkadaşım Mehmet SOY'a, çalışmanın her anında yardımları ile beni destekleyen kıymetli arkadaşım Serhat TÜRKYILMAZ'a, çalışma süresince kıymetli yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım ve meslektaşım Abdullah AKBAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca yanımda olan, beni her zaman destekleyen, hiçbir zaman haklarını ödeyemeceğim ve her zaman seveceğim canımın içi annem Fatma ARPAK ve pek kıymetli babam Mehmet ARPAK'a en içten sevgilerimi saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR iv

İÇİNDEKİLER v

KISALTMA LİSTESİ vii

ŞEKİL LİSTESİ viii

TABLO LİSTESİ x

ÖZET xi

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 6

1.3 Hipotez 6

2 KEMİK DOKU, BİYOMALZEMELER VE MANGAN 8

2.1 Kemik Doku, Yapısı ve Özellikleri 8

2.1.1 Kemik Hücreleri 10

2.1.2 Kemik Oluşumu ve Resorpsiyonu 11

2.1.3 Kemiğin Mekanik Özellikleri 13

2.2 Kemik Doku Mühendisliği ve Biyomalzemeler 14

2.2.1 Doğal Biyomalzemeler 17

2.2.2 Sentetik Biyomalzemeler 19

2.2.3 Kalsiyum Fosfat Seramikler 27

2.3 Mangan, Temel Özellikleri ve İnsan Vücuduna Etkileri 33

2.3.1 Temel Özellikleri 34

2.3.2 İnsan Vücuduna Etkileri 34

3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR 37

3.1 Deneylerde Kullanılan Malzemeler ve Özellikleri 37

3.2 Numunelerin Hazırlanması 37

3.3 Deneysel Çalışmalar 39

3.3.1 Yoğunluk, Mikroyapı ve Yapı Analizi 39

3.3.2 Mekanik Testler 40

3.3.3 In Vitro Biyolojik Testler 42

4 DENEYSEL BULGU VE TARTIŞMA 45

4.1 Yoğunluk Analizi 45

4.2 SEM Analizi 46
4.3 FTIR-ATR Analizi 48
4.4 XRD Analizi 49
4.5 Mekanik Değerlerin Analizi 52
4.6 Hücre Kültürü Çalışmaları 53
4.6.1 Metabolik Aktivite ve Canlılık 53
4.6.2 Osteoblastik ve Osteojenik Farklılaşma 56
SONUÇLAR VE ÖNERİLER **58**
KAYNAKÇA **61**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **71**

KISALTMA LİSTESİ

ALP	Alkalin Fosfat
CAL	Klinik Ataşman Seviyesi
CaP	Kalsiyum Fosfat
EPR	Elektron Paramanyetik Rezonans FBS: Fetal Sığır Serumu
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi
HA	Hidroksiapatit
HV	Vickers Mikro Sertlik
mMSC	Mezenkimal Kök Hücreleri
Mn	Mangan
PPD	Problama Cep Derinliği
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCP	Trikalsiyum Fosfat
Ti	Titanyum
UV	Ultraviyole
XRD	X-Işını Kırınımı
Ve diğ	ve diğerleri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Trabeküler ve kortikal kemik [17] 9
Şekil 2. 2. Olgun bir kemik içerisindeki kemik hücreleri [22] 10
Şekil 2. 3. Endokondral kemikleşme [22] 12
Şekil 2. 4. Mezenşimal (İntramembranöz) kemikleşme [22] 13
Şekil 2. 5. Biyoaktivitelerine göre biyoseramikler (a) biyoinert, (b) biyoaktif, (c) yüzey aktif, (d) biyoemilebilir seramik malzeme [18] 16
Şekil 2. 6. Fibrinojenden fibrin oluşumunun bir mekanizması [31]. 19
Şekil 2. 7. Metal üzerine metal total kalça protezi sonrası oluşan metallozisin makroskopik görünümü [49] 20
Şekil 2. 8. Ortopedide kullanılan kompozitler ve kullanım yerleri [18] 25
Şekil 2. 9. BCP seramiklerinin morfolojisi ve mikro yapıları. [76]. 28
Şekil 2. 10. HAp (a–b) ve Ge-HAp'ın (c–d) SEM görüntüleri. Ölçek çubukları 3 μm (a), 200 nm (b, c) ve 100 nm'dir (d) [84]. 30
Şekil 2. 11. β-TCP granülleri için taramalı elektron mikroskobu sonuçları. Beyaz oklar ara bağlantıları temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 20× [85]. 31
Şekil 2. 12. Manganın genel görünümü [99] 34
Şekil 3. 1. RETSH-S100 marka değirmen, öğütme kabı 38
Şekil 3. 2. Basma çelik kalıplar ve Presleme cihazı 38
Şekil 3. 3. Nabertherm LHT 02/17 marka sinterleme fırını 39
Şekil 3. 4. Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş pelet numuneler 39
Şekil 3. 5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) 40
Şekil 3. 6. MV Shimadzu mikrosertlik test cihazı 41
Şekil 3. 7. Devotrans DVT basma test cihazı 41
Şekil 4. 1. 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C sıcaklıklarda sinterlenen basit ve Mn katkılı β-TCP bazlı seramik peletlerin yoğunluk değerleri (g/cm3) 46
Şekil 4. 2. 1000 °C ve 1300 °C'de sinterlenmiş β-TCP bazlı numunelerin SEM görüntüleri 47
Şekil 4. 3. (a) 1000 °C, (b) 1100 °C, (c) 1200 °C ve (d) 1300 °C'de sinterlenmiş basit ve Mn katkılı β-TCP esaslı seramiklerin FTIR-ATR spektrumları. Saf ticari β-TCP tozunun spektrumu (Sigmα-Aldrich, CAS no. 7758-87-4, saflık ≥%98) karşılaştırma için grafiklerin alt kısmında sunulmaktadır (mavi çizgi ile). 48
Şekil 4. 4. (a) 1000 °C, (b) 1100 °C, (c) 1200 °C ve (d) 1300 °C'de sinterlenmiş basit ve Mn katkılı β-TCP bazlı seramiklerin XRD desenleri. Altıgen HA

(kırmızı), eşkenar dörtgen β-TCP (mavi) ve ortorombik α-TCP (kırmızı) fazlarının ICDD referans dosyaları, grafiklerin alt kısmında çubuklar olarak karşılaştırma için temsil edilmektedir. Kübik Mn (ICDD: 04-004-9077) çizgileri,grafiklerde sarı çizgiler olarak görüntülenir. 50

Şekil 4. 5. 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C'de sinterlenmiş basit ve Mn katkılı seramiklerde faz bileşiminin, Rietveld analizi ile belirlendiği şekilde evrimi 51

Şekil 4. 6. Mekanik test sonuçları: (a) basma dayanımı; (b) Vickers sertliği ve (c) 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C'de sinterlenmiş β-TCP bazlı numunelerin elastik modülü..... 52

Şekil 4. 7. (a) silindirik peletler ve (b) toz numuneler biçiminde saf ve Mn katkılı β-TCP bazlı sinterlenmiş seramiklerin varlığında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı 54

Şekil 4. 8. (a,b) 7 ve (c,d) 21 gün boyunca MC3T3-E1 hücreleri ile inkübe edilen S0.05 Mn katkılı β-TCP bazlı sinterlenmiş peletlerin yüzeyinde toplanan SEM görüntüleri. Büyütme: (a,c) 2500×; (b,d) 5000×..... 55

Şekil 4. 9. Saf ve Mn katkılı β-TCP bazlı seramikler üzerinde kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşması ve mineralizasyonu: (a) ALP aktivitesi ve (b) 405 nm'de okunan Alizarin Kırmızısı boyama absorbans değerleri. 57

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. Kemiğin Mekanik Özellikleri [17] 14
Tablo 2. 2. Bioseramikler [82]. 22
Tablo 3. 1. Karışımların kodları ve ağırlıkça oranları 37
Tablo 4. 1. Karışımların kodları ve ağırlıkça oranları 51

ÖZET

Seramik Esaslı Kompozit ile Biyouyumlu Yapay Doku Oluşturulması

Mehmet Can ARPAK

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sibel DAĞLILAR

Eş-Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Cevriye KALKANDELEN

Biyomalzemeler, vücudun doku veya organlarının değerlendirilmesi, tedavisi, büyütülmesi, onarımı veya değiştirilmesi için kullanılır. Çeşitli kemik sorunlarına cevap veren mükemmel özelliklere sahip iki veya daha fazla malzemeden oluşan kompozit yapıda biyomalzemeler, kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. En ideal kemik implantı özelliği, osteoindüktif kemik dokusu rejenerasyonunu indükleyebilmesi ve kendisinin yavaş yavaş bozunabilir olarak yeni kemik ile yer değiştirmesidir. Hidroksiapatit (HA)'ten daha iyi osteoindüktivite ve bozunabilirliğe sahip olan β-TCP, son zamanlarda büyük ilgi görmüştür ve kemik grefti araştırmalarında temel malzemelerden biri haline gelmiştir. Mangan (Mn), insan organizmasında kemik gelişiminde önemli rol oynayan temel bir elementtir. Kemik ve kıkırdak matrisinin oluşumunda glikoziltransferazlar gibi çeşitli enzimlerin bir kofaktörü olarak görev yapar. Manganın insan vücudu için mutlak önemli derecede pozitif etkileri mevcut iken yüksek dozda vücuda alındığında toksik özelliği de bilinmektedir.

Bu çalışmada, kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik β-TCP türevi biyoseramiklerin morfolojik özellikleri, mekanik performansı ve in vitro biyolojik tepkisi incelenmiştir. Bu amaçla saf β-TCP ve ağırlıkça %0.01, %0.05, %0.1, %0.5 ve %1 Mn katkılı beş farklı karışım, 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C lik dört farklı sıcaklıkta sinterlenmiştir. Yapısal analizler sonucunda, 1000 ve 1100 °C'de sinterlemeye tabi tutulan tüm numunelerin ana faz olan β-TCP'den ve HA'ten oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca Mn katkı miktarına bağlı olarak 1000 ve 1100°C'de faz oranı değişikliği kaydedilmemiştir. 1200 – 1300 °C sinterleme sıcaklıklarında α-TCP oluşumu yanında hem β-TCP hem de HA fazları gözlemlenmiş, bununla birlikte ağırlıkça %0.05 Mn katkısı ile yoğunluk açısından doyuma ulaşılmıştır. Elde edilen seramik esaslı kompozit numunelerde osteoblastik hücrelerin (MC3T3-E1) canlılığı MTT testi ile, hem toz hem de pelet formunda incelenmiştir. Ağırlıkça %0.1 oranından daha düşük Mn katkılı seramiklerin, saf β-TCP'ye göre osteoblast hücreleri için daha uygun bir mikro-ortam verdiği ve 21 güne kadar hiçbir sitotoksik etki kaydedilmediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Manganez katkılandırma, β-trikalsiyum fosfat, sito-uyumluluk.

ABSTRACT

Creating Biocompatible Artificial Tissue with Ceramic Based Composite

Mehmet Can ARPAK

Department of Metallurgical and Materials Engineering

Master of Science Thesis

Advisor: Prof. Dr. Sibel DAĞLILAR

Co-advisor: Assist.Prof.Dr. Cevriye KALKANDELEN

Biomaterials are used for the evaluation, treatment, augmentation, maintenance or replacement of body tissue or organs. Composite structure biomaterials consisting of two or more materials with excellent growth responsive to various bone structures are widely used in bone tissue engineering. The most ideal bone implant feature is that it can induce regeneration of osteoinductive bone tissue and replace it with new bone as it is slowly degraded in itself. β-TCP, which has better osteoinductivity and degradability than hydroxyapatite (HA), has recently attracted great interest and has become one of the main ingredients in bone graft research. Manganese (Mn) is an essential element that plays an important role in bone cells in the human organism. It acts as a cofactor of various enzymes such as glycosyltransferases in the construction of bone and cartilage matrix. While manganese has excellent positive results of absolute importance for the human body, its harmful properties are also known in the high-dose lines.

In this study, morphological properties, mechanical performance and in vitro biological response of β-TCP derivative bioceramics for bone tissue engineering applications were investigated. For this purpose, pure β-TCP and five different mixtures with 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5% and 1% Mn additives by weight were sintered in four different ways at 1000, 1100, 1200 and 1300 °C. As a result of the structural analysis, it has been observed that all samples, subject to sintering at 1000 and 1100 °C, are composed of the main phase β-TCP and HA. Also, depending on the amount of Mn additive, the phase ratio did not change at 1000 and 1100°C. In addition to the formation of α-TCP at 1200 – 1300 °C sintering temperature, both β-TCP and HA phases were observed, however, saturation was reached in terms of temperature with the contribution of 0.05% Mn by weight. Both powder and pellet reflections by live MTT test of osteoblastic cells (MC3T3-E1) in the obtained ceramic-based composite samples. It was determined that 0.1% wt% Mn doped ceramics gave a more favorable microenvironment for osteoblast cells than pure β-TCP and no cytotoxic effects were recorded until 21 days.

Keywords: Manganese doping, β-tricalcium phosphate, cytocompatibility.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Artan yaşam beklentisi ve yaşlanan dünya nüfusuyla birlikte kas-iskelet sistemi problemleri, kırıklar, osteoporoz ve kemik metastazları gibi hastalıklarda da hızlı bir artış görülmüştür [1]. Yaşlılık, trafik kazası, kırık kaynamama, kemik tümörü rezeksiyonu vb. nedenlerle oluşan büyük kemik defektleri veya yaralanmaları ortopedide ciddi problemler olup sağlığa ve yaşam kalitesine büyük zararlar verirler. [2].

Kemik dokusu, travma, patoloji ve rezorbsiyon sonucu kırılmaya yatkındır. Kemik sabitleme ve onarım elemanları geleneksel olarak metallerden üretilir ve klinik olarak kullanılır. Paslanmaz çelik, titanyum ve alaşımlarıdan, kemik dokusu tedavilerinin çoğunda faydalanılır [3]. Kemiklerin belirli bir iyileşme ve/veya yenilenme kapasitesi olmasına karşın büyük segmental kemik defektlerinde bu durum tek başına sağlanamaz [2].

Biyomalzemeler, kemik doku mühendisliğinde, iskeletlerin temel bileşeni olarak önemli bir görev üstlenirler. Geçmişten kalıntılar, insan veya hayvan kalıntıları ve dişleri, mercanlar, kabuklar, ahşap gibi materyallerin ve çeşitli metallerin(altın, gümüş ve amalgam) eksik insan kemikleri ve dişlerinin yerine ikame malzeme olarak kullanıldıklarını kanıtlamıştır. Örnek olarak, eski zamanlarda Etrüskler, hasarlı dişleri öküz kemiklerinden elde edilen yapay greft ile değiştirmeyi öğrenmişlerdir. 1960'ların başında, biyolojik kemik ikame malzemelerinin sınırlamaları, “Biyomalzemeler” diye adlandırılan bir alanın ortaya çıkmasına neden olmuştur. Biyomalzemelerin kullanım nedenleri, vücudun doku veya organlarının değerlendirilmesi, tedavisi, büyütülmesi, onarımı veya değiştirilmesi olarak tanımlanır. Eski alternatifler çoğunlukla biyoinerttir (biyolojik olarak inert) ve bu materyaller çevre dokularla etkileşimleri az ve hatta insanlar için toksisitesi yüksek olan malzemelerdir. Sitotoksik olmaması, işlenebilir olması, biyolojik olarak parçalanabilir olması, biyoaktif ve in vivo osteokondüktif olması ideal bir

biyomalzeme özellikleridir. İskelet sisteminde çeşitli sorunların giderilmesi için, mükemmel özelliklere sahip iki veya daha fazla malzemeden oluşan kompozit malzemeler kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılır [2].

Metaller, polimerler ve seramikler dahil olmak üzere çok çeşitli sentetik malzemeler implant ve kemik grefti olarak kullanılır. Bununla birlikte, kemik dokusu için en çok çalışılan malzemeler kalsiyum fosfat seramikleri, özellikle hidroksiapatit (HA), β-trikalsiyum fosfat (β-TCP) ve bunların karışımları bifazik kalsiyum fosfatlar (BCP) olarak adlandırılır. Çok fazla deneye konu olmasının nedeni, kemiğin ana bileşeninin apatitik bir kalsiyum fosfat minerali olmasıyla açıklanabilir. İmplant olarak HA sentezlenmesi, genellikle bir kalsiyum karbonat şablonunun yüksek sıcaklıkta sinterlenmesi veya hidrotermal dönüşümü ile olur. Her iki durumda da HA, kemik mineralinden çok daha kristallidir, bu özellik implantları kimyasal olarak daha kararlı ve dolayısıyla implant uygulamasında bozunmaz hale gelir[4].

Kemik dokusu rejenerasyonunu indükleyebilme ve kendisinin yavaş yavaş bozunabilirlik veya emilebilirlik olarak adlandırılan yeni kemik ile değiştirilme özelliğine sahip olan greftler, en ideal kemik greftleridir. HA'dan daha iyi osteoindüktivite ve bozunabilirliğe sahip olan β-TCP, son zamanlarda büyük ilgi görmüştür ve potansiyel olarak umut verici bir kemik grefti ikamesi haline gelmiştir. β -TCP, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin (mMSC) kemiğe proliferasyonunu ve farklılaşmasını indükler. β-TCP'nin, hayvan deneylerinde ve klinik uygulamalarda, kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında kademeli olarak bozunduğu ve sonunda yerini olgun yeni kemik aldığı gözlemlenir. Bu seramik implantların başarısının anahtarı, özel tasarımdan sonra kemik dokusu vaskülarizasyonunu indükleyebilmesidir. Bununla birlikte, zayıf mekanik özellikler gibi dezavantajlar, uygulamalarını ciddi şekilde sınırlar [5].

Mangan (Mn), insan organizmasında kemik gelişiminde önemli bir rol oynayan temel bir elementtir. Kemik ve kıkırdak matrisinin oluşumunda yer alan glikoziltransferazlar gibi çeşitli enzimlerin bir kofaktörü olarak görev yaptığı, integrinin ligand bağlanma afinitesini artırdığı ve osteoblast yapışmasını aktive ettiği gözlemlenmiştir. Mn iyonlarının katkısının, kalsiyum hidroksiapatit (HA) kaplamaların biyoaktivitesinde ve kalsiyum fosfat bazlı seramiklerin

osteogenezinde iyileşmelere sebep olduğu önceki çalışmalar ile kanıtlanmıştır [6]. Mn ayrıca aminoasitlerin, kolesterolün ve karbonhidratların metabolizmasında yer alır, üreme, sinir ve bağışıklık sistemlerinin sağlığının korunmasına yardımcı olur ve kan şekeri regülasyonu, kan pıhtılaşması ve kıkırdak ve yağlayıcı sıvı oluşumunda rol oynar [7].

Mn'nin çevre ve insan vücudu üzerindeki etkileri araştırılmış olmasına rağmen, uzun vadeli etkileri hala bilinmemektedir [7], [8]. Mn yüksek dozlarda kullanıldığında toksisiteye yol açabileceğinden dikkatli önlemler gereklidir. Parkinson hastalığına benzer nörodejeneratif bozuklukları indükleyebilir [9]. Sinir sistemi yüksek Mn alımından olumsuz etkilenebilirken, eksikliğine bağlı olarak iskelet bozuklukları, kısırlık, kalp rahatsızlıkları, hipertansiyon ve değişmiş-bozulmuş lipid ve karbonhidrat metabolizması gibi çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilir [7], [10]. İskelet deformiteleri ve testis disfonksiyonu da meydana gelebilir [11].

Sinusaite ve arkadaşları [6], Mn katkısının trikalsiyum fosfat (TCP) polimorflarının düşük sıcaklıkta sentezine etkisini, aynı koşullar altında ıslak çökeltme yöntemiyle hazırlanan ve 700°C'de tavlanan α ve β-TCP polimorflarında incelemişlerdir. % 1 ila 5 mol aralığında Mn katkılı kalsiyum fosfatlar incelenmiş ve istenen polimorfun oluşumu, hazırlanan çökeltilerdeki Mn içeriği değiştirilerek kontrol edilmiştir. Artan Mn içeriğinin β-TCP oluşumuna neden olduğu, düşük Mn katkılama seviyesi ile α-trikalsiyum fosfat (α-TCP) elde edilirken, ara Mn bileşimleri için iki polimorf karışımının elde edildiği bulunmuştur. Ayrıca, Mn iyonlarının katılması, nispeten düşük sıcaklıkta, 700 °C'de β-TCP sentezine izin vermiştir. Sitotoksisite testinde, en yüksek Mn bileşimine sahip numunelerde bile Mn iyonlarının herhangi bir toksik etkisine rastlanmamış, aksine, 1 mol Mn'nin α-TCP'ye katılması ile daha yüksek hücre canlılığı değerleri gözlemlenmiştir. 2020 yılında Sinusaite ve arkadaşları [6], bir dizi Mn katkılı α-TCP tozunu, ıslak birlikte çöktürme yöntemi ve ardından yüksek sıcaklıkta tavlama ve termal su verme ile sentezlemiştir. %0,2 ile %1 mol arasında değişen bir katkı seviyesine sahip bir dizi Mn katkılı α-TCP tozu, yüksek sıcaklıkta tavlama ve termal söndürmenin ardından birlikte çöktürme yöntemiyle başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. XRD, FTIR ve element analizi sonuçları, önerilen sentetik yaklaşımın iyi bir faz saflığı ve kontrol edilebilir kimyasal bileşim

ile Mn katkılı α-TCP sentezi için uygun olduğunu doğrulamıştır. Sentezlenen örneklerin optik özellikleri fotolümünesans açısından incelenmiştir. 408 nm'de uyarma altında Mn içeren tozların, yaklaşık 630 nm'de maksimum merkezlenmiş 525 ila 825 nm aralığında bir geniş bant emisyonu ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Emisyon yoğunluğunun Mn bileşimine bağlı olduğu ve Mn içeriği arttıkça arttığı bulunmuştur. Aksine, fotolümünesans ömür değerleri, Mn içeriğinin artmasıyla kademeli bir düşüş göstermiştir. Sıcaklığa bağlı fotolümünesans ölçümleri, daha düşük sıcaklıklarda kademeli ve önemli bir emisyon yoğunluğu artışı sergilemiştir [6].

Torres ve arkadaşları [9], Mn katkısının β-trikalsiyum fosfatın yapısı, mikroyapısı ve biyolojik özellikleri üzerindeki etkisini araştırmıştır. Mn içeriği %0 ile %10 mol arasında değişen Mn katkılı (MnTCP) tozlar, sulu bir çökeltme yöntemi ve ardından 800°C'de sinterleme yoluyla elde edilmiştir. Mn'nin β-TCP yapısına başarılı bir şekilde dahil edilmesi, yapısal Rietveld iyileştirmesi ile birleştirilmiş nicel X-ışını kırınımı (XRD) faz analizi ile kanıtlanmıştır. Artan Mn bileşimleri nedeni ile, a ve c ekseni kafes parametrelerinin eğilimlerinin azalmış ve Mn katkısı ayrıca β-TCP tozlarının mikroyapısı değişmiştir. Tozların varlığında büyütülen MC3T3-E1 osteoblastik benzeri hücrelerin in vitro proliferasyon ve farklılaşma deneyleri, Mn katkılı β-TCP'nin biyolojik faydalarının daha düşük Mn birleşme seviyeleri ile sınırlı olduğunu ve potansiyel olarak yüzey mikro yapılarıyla ilişkili olduğunu ortaya çıkartmıştır. Mn1-βTCP bileşimi, osteorejenerasyonda β-TCP malzemelerinin gelecekteki uygulamaları için potansiyel olarak iyi bir aday olduğunu kanıtlamıştır [9].

Fadeeva ve arkadaşları [12], kemik içi titanyum (Ti) implantlar için biyoaktif mangan (Mn) katkılı seramik kaplamalar geliştirmek için deneyler yapmıştır. Kaplamaların hazırlanmasında ark plazma biriktirme prosedüründen faydalanılmıştır. Kaplamaların karakterizasyonu için X-ışını Kırınımı, Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi ve Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) yöntemleri kullanılmıştır. Kaplamalar homojendir, ana faz yaklaşık %67 β-TCP ve küçük faz yaklaşık %33 hidroksiapatitten (HA) oluşur ve Mn içeriği ağırlıkça %2.3 ölçülmüştür. EPR spektroskopisi, Mn iyonlarının TCP yapısı içerisinde olduğu ve kaplamada Mn^{2+} ve Mn^{3+} oksidasyon

durumlarında, küme biçiminde toplanarak bulunduğunu kanıtlamıştırr. Birikmiş kaplamaların ıslanma temas açısı, hücrelerin yapışması ve çoğalması için uygun olduğu gözlemlenmiştir. 90 gün boyunca fizyolojik solüsyonda in vitro ıslatma, faz bileşiminde ciddi bir değişikliğe yol açmıştır; kalsiyum karbonat ve oktakalsiyum fosfata dönüşüm gerçekleşmiş ve Mn yok olmuştur. Escherichia coli, Enterococcus faecalis ve Pseudomonas aeruginosa bakteri suşlarına karşı antibakteriyel aktivitenin olmadığı gözlemlenmiştir. MTT testi kullanılarak kaplamalar üzerinde NCTC L929 hücre hattının fare fibroblastlarının metabolik aktivitesi üzerine yapılan bir çalışma, hücre kültürü üzerinde toksisite göstermediğini kanıtlamıştır. Hücrelerin yapışması ve çoğalması için ise uygun ortamı oluşturduğu belirtmişlerdir. İnsan dişi postnatal dental pulpa kök hücrelerinin iyi bir yapışma, yayılma ve proliferatif aktivitesi göstermiştir. Geliştirilen kaplamalar, ortopedi ve diş hekimliğinde implant uygulaması için umut verici olduğu gözlemlenmiştir [12].

Li ve arkadaşları [13], Mn'nin β-TCP'ye eklenmesiyle Mn içeren β-trikalsiyum fosfat (Mn-TCP) biyoseramik modeli hazırlamışlardır. Mn'nin β-TCP'ye dahil edilmesi, oksijen ve nitrojenden malzemenin arındırılmasını önemli ölçüde başarmıştır ve Mn-TCP biyoseramiklerinin antioksidan özelliklere sahip olabileceğini kanıtlamıştır. In vitro ve in vivo bulgular, Mn-TCP biyoseramiklerinden salınan Mn^{2+} iyonlarının osteoklastların oluşumunu ve işlevini belirgin bir şekilde engelleyebileceğini, osteoblastların farklılaşmasını teşvik edebileceğini ayrıca in vivo osteoporotik koşullar altında kemik rejenerasyonunu hızlandırabileceğini ortaya koymuştur. Mekanik olarak, Mn-TCP biyoseramikleri osteoklastogenezi inhibe etmiş ve Nrf2 aktivasyonu yoluyla ROS'u temizleyerek osteoporotik kemik kusurlarının rejenerasyonunu desteklemiştir. Bu sonuçlar osteokondüktivite, ROS süpürme ve kemik rezorpsiyonunu inhibe etme yeteneklerine sahip Mn içeren biyoseramiklerin osteoporotik kemik defekti tedavisi için ideal bir biyomalzeme olabileceğini düşündürmektedir [13].

1.2 Tezin Amacı

HA ve β-TCP kemik mineral bileşeni ile kimyasal benzerlikleri ve yüksek biyouyumlulukları nedeniyle kemik dokusu mühendisliğinde düzenli olarak en çok kullanılan sentetik malzemelerdir. β-TCP'nin HA'dan daha yüksek oranda çözündüğü ve kemik dokusunun daha hızlı büyümesine ve iyileşmesine izin verdiği

bilinmektedir. β-TCP'nin daha hızlı biyolojik olarak parçalanabilirliği, onu kemik tedavisinde hem tek kullanımlık hem de HA (yani BCP'ler, bifazik kalsiyum fosfatlar) ile kombine kullanım için uygun kılmaktadır.

Mn kemik rejenerasyonu için gerekli bir elementtir [9], [14], [15]. Mn, kemiklerdeki magnezyumun aktivitesini destekler [11]. Mn'nin kemik dokunun iyileşmesi yönünde sağladığı faydalar bilinmesine rağmen Kalsiyum Fosfat (CaP) bileşikleri ile oluşturacağı kompozit maddeler için yüksek miktarda çalışma bulunmamaktadır. Mn'nin CaP bileşiklerinin mekanik özelliklerini insan vücudunda ve kemik doku yaralanmalarında kullanımı için arttıracağı ayrıca sahip olduğu kimyasal özellikler sayesinde faydalı olup kullanımının yaygınlaşması için daha çok çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, hem ağırlıkça %0.01 – 1 aralığında düşük dozlarda Mn katkılı hem de 1000 – 1300 °C aralığında değişen sinterleme sıcaklığının mikroyapı, yapısal ve in vitro biyolojik özelliklere etkisi incelenmesi, ayrıca, literatür çalışmalarında az sayıda bulunan, bu tip seramik esaslı kompozit malzemelerin mekanik özelliklerinin (Vickers sertliği, basma dayanımı ve elastisite modülü) özel olarak değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

1.3 Hipotez

Mn, kemiklerin iyileşmesinde gerekli olan bir elementtir fakat Mn'nin toksik olduğu ve vücutta bulunan Mn oranın yüksek olmasının insan sağlığını kötü yönde etkilediği daha önce yapılan araştırmalarda gözlemlenmiştir. Bu nedenle eser miktarda kullanılmalıdır. Eser miktarda kullanılan Mn'nin, β-TCP'ın mekanik özelliklerini ve biyouyumluluk özelliklerinde ne miktarda olumlu yönde katkı sağlayacağı ana hipotez olarak belirlendi. Bu çalışmada, hem ağırlıkça %0,01 – 1 aralığında düşük dozlarda Mn katkısının hem de 1000 – 1300 °C aralığında sinterleme sıcaklığının morfolojik, yapısal ve in vitro biyolojik özelliklere etkisi incelendi.

2
KEMİK DOKU, BİYOMALZEMELER VE MANGAN

2.1 Kemik Doku, Yapısı ve Özellikleri

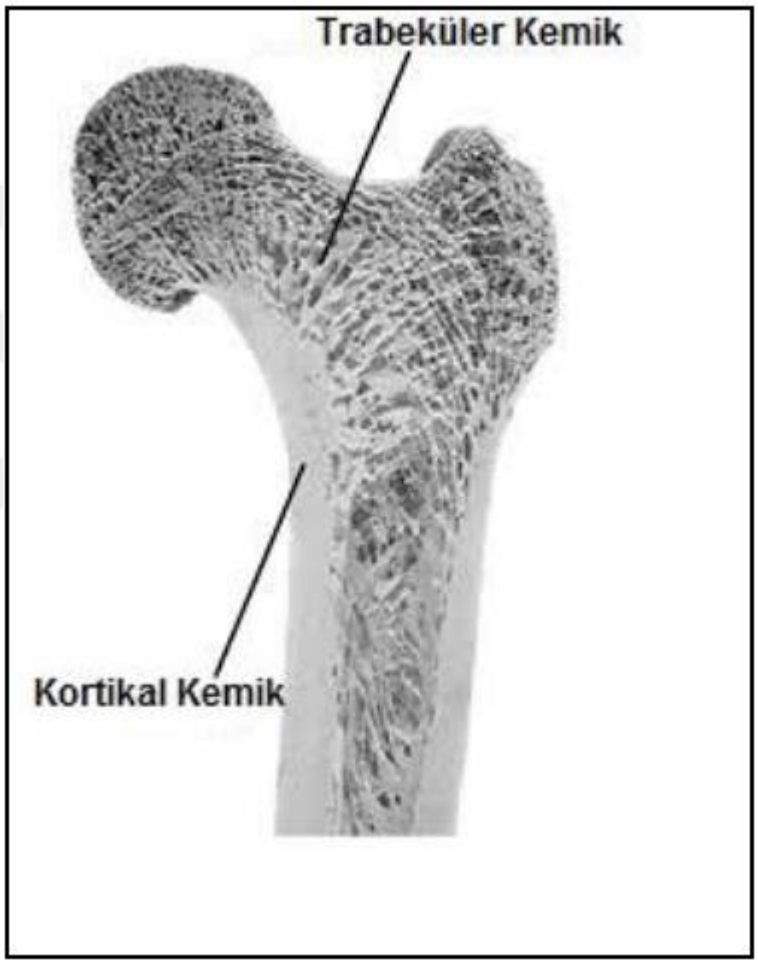
Kemik, canlıda en sert ve temel yapı olmak ile birlikte, rejenerasyon kabiliyetine sahiptir. Ayrıca omurgalılarda iskelet sistemini oluşturur. Kemik bulunduğu yerdeki kullanımına ve ona karşı gelen kuvvetler ile çalışmayı sağlayabilecek değişken bir dokudur. Değişken bir yapıda doku olma özelliği ile birlikte organ sistemi olarak da görev yapmaktadır. Bağ dokunun özel bir şekli olarak tanımlanır. Kemik doku dışındaki bağ dokularındaki gibi hücreler, lifler ve temel maddelerden meydana gelmekte olup yapısında kalsiyum olmasından ötürü sertleşmiş bir yapıdadır. Kemik dokunun kompleks organizasyonu ve benzersiz özellikleri insan vücudunda pek çok fonksiyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır [1].

Kemik, kalsiyum içeren inorganik faz kristallerinin gömülü olduğu bir organik fazdan oluşan kompozit bir doğal canlı dokudur. Kemik ağırlıkça yaklaşık %30 matriks, %60 mineral ve %10 su içermektedir. Kemik matrisi, öncelikle gerilme mukavemetinden sorumlu olan kolajendir. Kemik dokusu destek, koruma, harekete yardımcı olma, mineral biriktirme (Ca, P ve diğer iyonlar), enerji saklama (kemiklerdeki sarı kemik iliği) ve kan yapma fonksiyonlarına sahiptir [16]. Kemiğin mineral bileşeni, kemik dokusuna basma dayanımı veren kalsiyum fosfattır. Kortikal (kompakt) ve süngerimsi (trabeküler) olmak üzere iki tip kemik dokusu vardır (Şekil 2.1).

Kompakt kemiğin elastisite modülü 17–20 GPa ve basma dayanımı 131–224 MPa trabeküler kemikler için elastisite modülü 50–100 MPa ve basma dayanımı 5-10 MPa aralığındadır. [17].

Doğal kemiğin kemiğin içyapısını oluşturan trabeküler kemik süngerimsi bir dokudur. Kan, besin ve minerallerin taşınması, gözenekli yapısı sayesinde sağlanmaktadır. Kortikal kemiğin gözenekliliği %5 ile %10 arasında değişmektedir [18]. Trabeküler kemik, derece uzun kemik dokuların gövdelerinde yer alır ve eklem ucunda yer alan trabeküler kemikleri saran ve omurgaya dolanan şekilde dış

kabuk oluşturmaktadır. Kortikal kemik yoğun bir yapıya sahiptir ve traberküler kemik ile farklı özelliklere sahiptirler. Temel bileşenleri aynı olsa da bileşimleri farklı organik ve organik olmayan yapıdaki malzemeler ile birbirinden ayrı oranda porozite içerirler Kortikal kemik, trabeküler kemiğe göre 4 kat daha fazla yoğunluğa sahptir. Trabeküler kemiğin gözeneklilik değeri ise %30 ile %90 arasında değişkenlik gösterir (Şekil 2.1) [18].



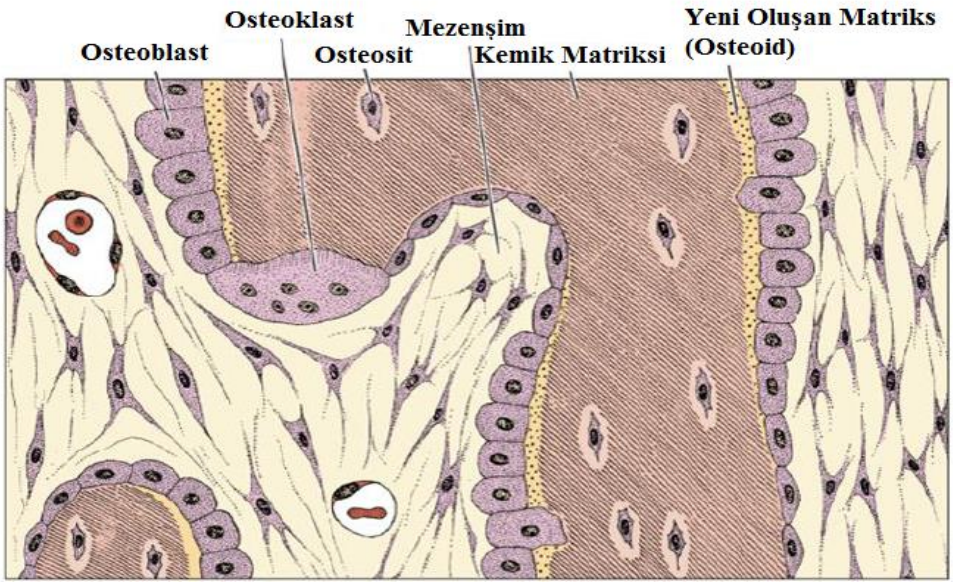
Şekil 2. 1. Trabeküler ve kortikal kemik [17]

Kemik dokusunun kendini yenileme ve iyileştirme konusunda olağanüstü bir yeteneği vardır. Bununla birlikte, büyük kemik defektleri ve karmaşık kırıklar, tıp camiası için hala önemli bir zorluk teşkil etmektedir [3]. Kemik, üzerine uygulanan strese cevap vermek için değişik şekillerde büyüyebilir. Bu olay "Wolff Yasası" olarak bilinmektedir [18]. Çoğu kırık için kemik dokusu kendini iyileştirmekle birlikte, karmaşık kırıklar ve hastalıklar için tam iyileşmenin gerçekleşmesi için

genellikle dışarıdan müdahale gerekmektedir. Tedaviyi kolaylaştıracak teknolojiler geliştirmek için bu iyileşme sürecine dahil olan mekanizmaları anlamak önemlidir. Kemik iyileşmesinin "doğrudan kemik büyümesi" ve "callous oluşumundan sonra dolaylı kemik büyümesi" olmak üzere iki temel mekanizması vardır [1].

2.1.1 Kemik Hücreleri

Osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar, kemiğin organik veya inorganik kompozit yapısında bulunan üç tip hücredir. Osteoblast hücrelerin metabolik aktifliği yüksektir ve kemik oluşumu görevini üstlenmektedirler. (Şekil 2.2) [19]. Osteoblast hücrelerin çekirdekleri endoplazmik retikulum ile sarılmıştır [20]. Yüksek düzeyde alkalen fosfataz aktivitesine sahiptirler. Bunun sonucu olarak kemik matriksinde kalsiyum depolanmasında osteoblastların etkili olduğu söylenebilir. Osteoblastlar, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasıyla oluşmaktadırlar. Yeni kemik oluşumunun durması ile osteoblastların aktiviteleri yavaşlar ve sonrasında tamamen durarak iğ şeklinde hücrelere dönüşüp osteosit yapısına geçerler [19].



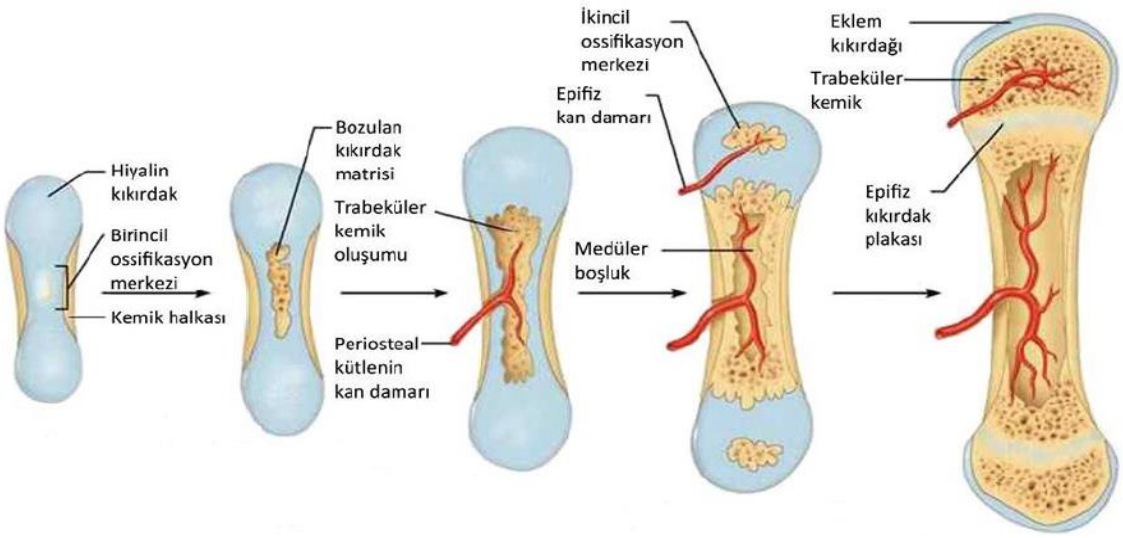
Şekil 2. 2. Olgun bir kemik içerisindeki kemik hücreleri [22]

Bir diğer kemik doku hücresi olan osteositler, lakünalar içerisinde matrikste yer alan olgun hücrelerdir (Şekil 2.2). Ostesitler, olgunlaşmış olan kemik hücreleri olup gelişimleri tamamlandığından sentez özellikleri yoktur. Fakat farklı kemik hücrelerine dönüşebilirler. Örneğin kemik yıkımı esnasında lakünalardan ayrılıp

dinlenme halinde olan osteoprogenitör hücrelere dönüşebilirler. Bunun yanı sıra osteoblastlar da osteoprogenitör hücrelerin dönüşümü ile oluşabilir. Ayrıca osteositlerin bir başka görevi de metabolik bir olay olan, kemik ile kan arasındaki kalsiyum ve fosfat konsantrasyonunun düzenlenmesinde yer almaktır [21].

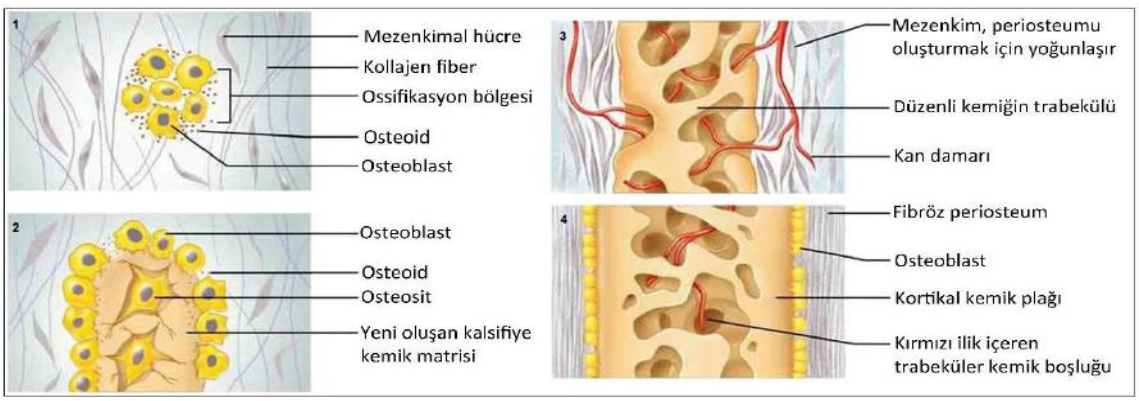
2.1.2 Kemik Oluşumu ve Resorpsiyonu

İnsanın vücudu içerisinde kemik doku endokonral ve mezenşimal olarak 2 farklı formda oluşmaktadır. Endokondral kemik oluşumunda kıkırdak doku etkin iken mezenşimal kemik oluşumunda ise bağ doku etkin olup her iki kemik oluşumunda da ilk oluşan kemik primer kemiktir (olgunlaşmamış kemik). Primer kemik dönüşür ve yerine olgun lamelli kemik doku almaktadır. Kemik oluşumu kemik yıkımıyla aynı anda gerçekleşmektedir. Kemik doku sürekli olarak yenilenmekte olan aktif bir doku olup kemik dokunun yenilenmesi kimyasal ve mekanik koşullarla ilişkilidir. Endokondral kemik oluşumu hyalin kıkırdağın yerini kemik dokunun almasıdır. Bilhassa uzun kemiklerin şekillenmesi endokondral kemik oluşumuyla gerçekleşir. Öncelikli olarak osteoblastlar osteositleri sentezler ve hyalin kıkırdakta diyafizin etrafında kemik halkası meydana gelir. Diyafizin merkezindeki kıkırdağın kalsifiye olması ile birlikte yapıdaki bozulmalar sonucunda boşluklar oluşur. İç kısımda bulunan boşlukların periosteol kütleyle ile kaplanması neticesinde trabeküler kemik meydana gelir. Ossifikasyon, osteoblastlar tarafından kemiğin şekillendirilmesi işlemidir. Ossifikasyon süresince medüler boşluk meydana gelir ve epifizde sekonder ossifikasyon merkezi meydana gelir. Sekonder ossifikasyon bölgelerini gelişmesi ile birlikte epifiz kemikleşmesi oluşur. Ossifikasyon bittiğinde hyalin kıkırdak yalnızca epifiz plakasında ve eklem kıkırdağında bulunabilir [23].



Şekil 2. 3. Endokondral kemikleşme [22]

Bir diğer kemik oluşum şekli olan mezenşimal kemik gelişimi ise genellikle yassı kemiklerin(kafatası vb.) yahut daha küçük/kısa kemiklerin oluşumunda aktiftir (Şekil 2.4). Bu kemik oluşumunda mezenşimal hücre organizasyonuyla kemik oluşur. Ossifikasyon merkezini, mezenşimal hücreler osteoblastlara farklılaşmak suretiyle oluşturur. Devamında osteoblastlar birkaç gün içinde mineralleşen osteoid sentezlemesine uygun hale gelir ve sentezleme başlar. Matris içine hapsolmuş durumdaki osteoblastlar da osteosit forma geçer ve eş zamanlı olarak çok sayıda kemikleşme merkezini bir araya gelip kaynaşması neticesinde trabüküler yapı meydana gelmektedir. mezenşim düzenli kemik damarlaşmış yapıdadır. Bu kemiğin dış yüzeyinde yoğunlaşmakta olup periosteuma dönüşür. Trabekül, periosteuma yakınlaşması ile daha kalın hale gelir ve devamında olgunlaşmış halde lamellar kemikle yer değiştiren düzenli kemiği oluştururur. Bununla birlikte, trabeküler kemiğin konumu, yapı içerisine doğrudur. Ayrıca damar biçiminde dokusunun yerini kırmızı ilik alır [22].



Şekil 2. 4. Mezenşimal (İntramembranöz) kemikleşme [22]

2.1.3 Kemiğin Mekanik Özellikleri

Kemikli trabeküler desteklerden ve ilik dolu boşluklardan oluşan süngerimsi kemiğin doğası, yapısal ve malzeme özellikleri olarak açıklanabilir. Malzeme özellikleri trabeküler desteklerin içsel özellikleri olarak adlandırılır. Yapısal özellikler ise gözenkelerin ve trabeküllerin dışsal özellikleri olarak tanımlanır. Yapısal özellikler incelenirken küresel stres deneyleri esas alınır, malzeme özellikleri ise çeşitli kemik patolojilerini, mikro düzeyde stres analizlerini ve implantlar etrafındaki kemik adaptasyonunu inceleyebilmek için olanak sağlar. İmplant-kemik ara yüzündeki gevşeme ve kemik rezorpsiyonu ise mikroseviye stres analizleri ile ölçülür [23].

Kortikal kemikte mekanik özellikler, gözeneklilik, mineralizasyon seviyesi ve katı matrisin organizasyonundan büyük ölçüde etkilenmektedir. Bu nedenle, makroyapısal düzeyde mekanik özellikleri ölçerek mikro özellikleri in vivo tahmin etmek zordur. Genel olarak, makroyapısal düzeyde kemiğin mekanik özellikleri için değerler bir kemikten diğerine ve aynı kemiğin farklı bölgeleri içinde değişmektedir [23]. Kemiğin anizotropik mekanik özelliklere sahip bir kompozit olarak tanımlanabilmesinin nedeni biyomekanik kuvvetler doğrultusunda bir yapıya sahip olmasıdır. Bir kemiğin farklı bölgelerinde farklı mekanik özellikler Tablo 2.1'de sunulmuştur [18].

Tablo 2. 1. Kemiğin Mekanik Özellikleri [18]

Malzeme	Elastisite Modülü (GPa)	En Yüksek Basma Dayanımı (MPa)	En Yüksek Çekme Dayanımı (MPa)
Yaş insan femuru (boyuna)	15,2-40,6	150-400	-
Kuru insan humerusu (boyuna)	15	183,3	117,8
Kuru insan humerusu (enine)	5,7	118,5	-
Kuru insan humerusu (açısal)	6,8	84,1	-
Taze dana kemiği	6,7	133,7	91,6
Hidroksiapatit	115,1	-	-

2.2 Kemik Doku Mühendisliği ve Biyomalzemeler

Kemik doku mühendisliği, kemik yapısına ek olarak kemik rejenerasyonunun özelliklerine benzer şekilde davranış gösterecek yeni malzemeler üretmek için çalışan bilim dalıdır. İlk olarak Çinlilerin ve Romalıların, ihtiyaçlara paralel olarak tunç ve bakır malzemelerini kullanmaları ile biyomalzemeler üzerindeki çalışmalar başlamıştır. Fakat 1900'lü yıllara kadar kullanılan malzemeler sonucunda yaşanan enfeksiyonlar sebebi ile çalışmalar genişletilmemiş ve kullanımı yaygınlaşmamıştır. Biyomalzemelerin tekrar popüler hale gelmesi, aseptik cerrahi yöntemlerinin kullanılmaya başlanması ile olmuştur [24]. İlk kalça protezi paslanmaz çelikten üretilmiştir. Üretildiği yıl 1938'dir. Bu tarihten önce 19. yüzyılda birçok başarısız deneme yapılmıştır. İlk paslanmaz çelikten kalça üretimini Philip Wiles gerçekleştirilmiştir. Brånemark ve ark [25] ise ilk kez titanyum elementini kullanan bilim insanlarıdır.

Kemik doku, kendini iyileştirme özelliğine ek olarak skar dokusu oluşturmadan rejenere olabilir. Buna rağmen, bu rejenerasyon bazen eksik kalabilir. Büyük yaralanmalar sonucunda veya birden çok parçalı kırık sonucunda kemiğin rejenerasyon kapasitesi kemiğin tam olarak iyileşmesi için yeterli gelemeyebilir. Bu tip durumlarda biyomalzemelerin özellikleri olumlu sonuçlar doğurabilir. Kemiklerin hasar görmüş kısımlarına yerleştirilecek biyomalzemeler, tedavinin hızlanması ve rejenerasyon sürecine işlevsel yardım sağlanabilmesi adına önem arz etmektedirler [26]. Orijinal kemik dokuya benzer şekilde üç boyutlu olarak üretilen biyomalzemeler, hücre çoğalması için moleküler büyüme faktörleri ile hücre dışı matriksleri birleşerek olumlu katkıda bulunurlar. Ayrıca bulundukları ortamda hücre canlılığı ve değişkenliği için dokuların veya organların gelişmesini sağlayan mikro çevreyi oluşturmaktadır [27], [28].

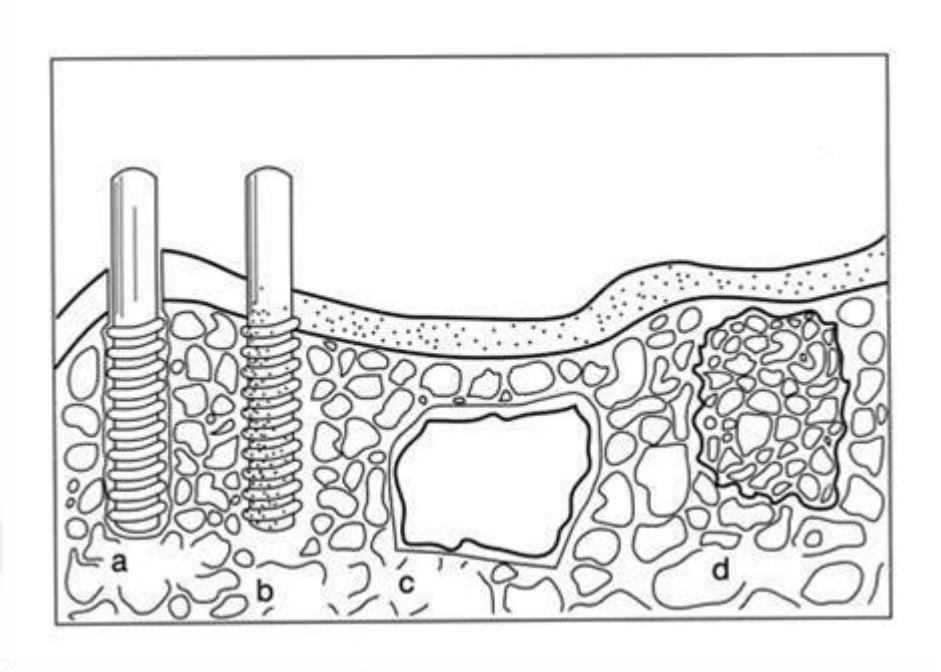
Optimum özellikteki kemik dolgu malzemesi, defekt olan bölgeyi tamamiyle kaplayacak ve kemiğin büyümesine ortam oluşturacak osteokondüktif formda olmalıdır. Bununla birlikte osteogenezis için canlı ostejenik hücreler bulundurmalıdır. Kemik dolgu malzemesinin özellikleri, tedavi uygulanan dokunun iyileşme hızı ile uyumlu, degredasyon hızı istenildiğinde değişitirilebilen ve vücut sıvılarının üretimini sağlayabilmek amacı ile gözenekli yapıda olmalıdır [24], [29].

Dünya çapında milyonlarca insanının ortak problemi, kemik ve eklem yıkımı ve iltihabıdır. İyileşme için ameliyat veya ikame malzeme kullanımı zorunludur. Yirmi birinci yüzyılda, biyomalzemeler tıp, diş hekimliği ve biyoteknolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Sadece 60 yıl önce bugünkü gibi biyomalzemeler yoktu ve "Biyomalzeme" kelimesi kullanılmamıştı. Yine de, tarih boyunca biyomalzemeler kullanılmıştır [30].

Ortopedik biyomalzemeler, kemik ve kıkırdak gibi çeşitli dokuları onarmak veya değiştirmek için tasarlanmış malzemelerdir. Biyomalzemeler 2 grup olarak gruplandırılır: Biyoinert malzemeler(1. nesil) ve biyoaktif - biyobozunur malzemeler (2.nesil). Uygulamaları göz önünde bulundurarak biyomalzemeler tasarlayan her neslin kendi işlevselliği vardır. Ayrıca, yeni nesiller ile malzemeler, önceki nesillerden gelenlerin kullanımı engellemez [31]. Biyo-inert malzemeler klinik kullanım için yaygın olarak başarıyla kullanılmıştır; fakat bazı sorunları vardır. Örneğin, çoğunlukla cerrahi olarak çıkarılıncaya kadar insan vücudunda sonsuza kadar kalan inert implantlardır. Biyobozunur materyallerin geliştirilmesi için sürekli araştırmaların ana itici gücü, kemik dokusu mühendisliğinin biyokimyasal ve biyomekanik gereksinimlerini karşılamak üzere özel olarak hazırlanmış özelliklere sahip yeni materyallere duyulan ihtiyaçtır. Temel kavram, ikame biyomalzemein çevreleyen hücrelerin/dokuların istila etmesi, büyümesi ve böylece yeni kemik oluşumuna doğru doku rejenerasyonunu yönlendirmesi için bir iskele görevi görmesidir. Kemik onarımı ve iyileşmesi gerçekleştikten sonra, hem klinik hem de biyomekanik bakış açısından in vivo degradasyon yoluyla iskelenin kaldırılması arzu edilir. Bu nedenle implant olarak kullanılabilecekleri ve çıkarılması için ikinci bir cerrahi olay gerektirmediği için biyolojik olarak bozunan / çözünen toksit etkisi olmayan biyomalzemeler tercih edilir. Biyolojik olarak parçalanabilen materyaller, mekanik destek sağlarken ve toksik olmayan ürünlere parçalanırken kemik dokusunun yenilenmesini ve onarım sürecini desteklemelidir [3].

Birinci nesil (biyoinert malzemeler) malzemeler, özelliklerinin gereksinimlerle eşleştirilmesiyle yönetilir. Toksik olmamak ve ihtiyaca göre değiştirilen dokunun fiziksel özelliklerini karşılamak ilk nesilin gereksinimidir. Bu nedenle, bağışıklık

tepkisini ve yabancı cisim tepkisini en aza indirmek için birinci nesil biyomalzemeler yetersiz kalmıştır [31].



Şekil 2. 5. Biyoaktivitelerine göre biyoseramikler (a) biyoinert, (b) biyoaktif, (c) yüzey aktif, (d) biyoemilebilir seramik malzeme [18]

İkinci Nesil biyomalzemeler, biyoaktif ve biyoabsorbe olabilen materyallerin geliştirilmesi ile tanımlanır. Biyoaktif materyaller, biyolojik yanıtı ve dokudan yüzeye biyomalzemein bağlanmasını geliştirmek için doku ortamı ile etkileşime girme yeteneğine sahiptir (Şekil 2.5). Biyoemilebilir materyaller, bozulmaya uğramış dokunun iyileşme sürecinde bozularak, ana dokunun iyileşmesine olanak verir. İkinci neslin ortaya çıkışının 1980 ile 2000 yılları arasında olduğu düşünülmektedir [31].

Biyomalzemeler doğal ve sentetik biyomalzemeler olmak üzere iki gruba ayrılır.

2.2.1 Doğal Biyomalzemeler

Bilim insanların dikkati, son senelerde yaptıkları araştırmalarda, biyobozunurluk ve biyouyumluluk özelliklerinde olumlu sonuçlara ek olarak toksisitelerindeki düşüş ile birlikte doğal içerikli biyomalzemelere yönelmiştir. Biyomalzemelerin avantajlı özelliklerine ek olarak hücre adezyonunu ve defekte uğrayan kemiğin

iyileşmesini teşvik edici özellikleri vardır. Fakat bu özelliklerine karşı biyomalzemeler mekanik açıdan zayıftır, düşük kimyasal stabiliteye sahiptir ve sentetik biyomalzemelere göre daha fazla enfeksyon riski taşımaktadırlar. [32], [34].

Kollajen bir polisakkarittir ve yapı olarak kemiğe benzerliği ile kemik doku mühendisliğinde geniş alanlarda yaygın biçimde kullanılır. Kollajen ayrıca ekstrasellüler matriks elemanı olma görevinin yanında dokulardaki diğer hücrelerle de etkileşim içindedir. Kollojeni vücudun absorbe ettiği ve diğer bütün hücreler ile uyum içinde olduğu bilinir. Toksik bir yapıya sahip olmaması, bununla birlikte farklı türler ile kullanıldığında bile az da olsa bağışıklık reaksiyonu göstermesi diğer olumlu özellikleridir. Kollajenler tabaka formunda, jel formda ya da gözenekli formda üretilebilir. Bozulmalarının kontrol edilmesinin güç olması, mekanik özelliklerinin dezavantaj yaratması gibi nedenler ile kemik doku mühendisliğinde kullanılırken bu özelliklerinin geliştirilmesi ve uygun hale getirilmesi gerekmektedir.

Çağraz bağlama ile diğer biyomalzemeler ve kollajen bağlanarak son ürünün daha güçlü hale getirilmesi ve absorbe oranının kontrol edilebilmesi sağlanabilir. Bugün biyomalzemelerde kollajen kullanımının yaygın olduğu alanlar protez implantları, kemik doku ve doku mühendisliğidir [35], [36].

Jelatin bir çeşit polimedir ve kollajenin hidroliz ile denatürasyonuyla üretilir. Jelatin; lizin, arginin, glutamik ve aspartik asit, lösin, izolösin, metiyonin, valin, glisin, prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerini barındırır [37]. Bu amino asitler, malzemeye hücre tanınması, çoğalma ve değişkenlik konularında avantaj yaratır. Bunlar ile birlikte jelatin, pozitif olarak biyouyumluluğa, fizyolojik ortamda degrede olma yeteneğine ve su için absorbe edebilme özelliklerine sahiptir. Tüm bunlar jelatini farmasötik nedenler ile kullanıma ve sert doku mühendisliği konusunda avantajlı bir konuma ulaştırır [38], [39].

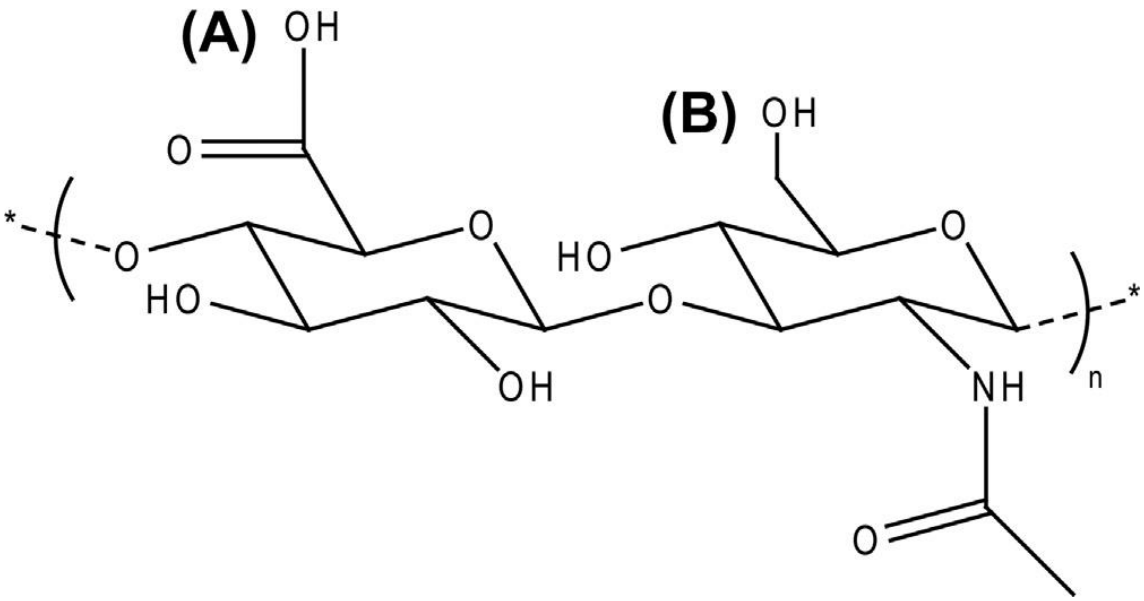
Aljinat, anyonik bir malzeme olmak ile birlikte, toksisite konusunda avantajlı bir malzemedir. Toksisitesi oldukça düşüktür. Aljinat, kahverengi alglerden izole edilir. Ek olarak aljinat, dokularda immün tepkimeye yol açmaz [40], [41].

Kitosanın kullanım alanları doku mühendisliği ile farmasötik ihtiyaçları kapsar. Kitosan biyomalzeme olarak alkalin çözeltisi veya kitin deasetilaz olduğu yerde

kitinin N-asetilasyonu sonucunda oluşturulur. Kitosanın absorpsiyon kabiliyeti yüksektir. Bununla birlikte, biyouyumlu ve biyobozunur özelliklere sahiptir. Esnektir ve gözenekli yapıdadır ve toksisitesi çok düşüktür. Dezavantaj olarak mekanik dengesizliği ve fiziksel olarak düşük karaktere olması negatif özellikleridir. Kitosanda bulunan hidroksiapatit kristallerinin, biyoseramikler veya biyocam ile karıştırılarak mekanik özelliklerini iyileştirmek mümkündür. [42], [43].

İpek biyomalzemesi, böcekler ve örümceklerin ürettiği doğal yapıda bir biyomalzeme olarak bilinir. İyi derecede esneklik kapasitesine sahip olmaları, üstün yük taşıma kabiliyetleri, gerilimlere çok iyi derecede dayanımı, termal olarak stabil olmaları ile düzenlemelerinin en baştan yapılabilmeleri ile doku mühendisliğinde uygun hale gelirler. Bombyxmori, ipek böceklerinin kozalarının iplikleridir. Nephila clavipes ise Nepve adı verilen örümceklerden elde edilir. İki biyomalzeme de doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılır [44], [45].

Fibrin, kanın pıhtılaşma aşamasında görev alan bir proteindir. Lifli yapıdadır. Trombin, polimerizasyonunun başlaması için görevlidir ve defektten sonra fibrin proteinin sentezlenmesi amacı ile bu görevi üstlenir. Fibrinin bir diğer görevi, nötrofillere ve makrofajlara fiziksel olarak destek sağlaması ve fibroblastların yaralanma bölgesinden geçebilmesi için olanak tanıyarak dokunun rejenerasyonunda iskelet görevi üstlenmesidir. Fibrinin ekstrasellüler maktiks elementleri için yapışma bölgeleri mevcuttur. Bu yapışma bölgeleri integrinler, büyüme faktörleri ve aynı zamanda fibronektin, fibulin, trompospondin'dir. Bu sayede bazı prosesler için iskele görevi üstlenirler: kök hücrelerin farklılaşması, anjiyogenez stimülasyonu ve kök hücre iletimi. Bozunma özellikleri kontrol altına alınamadığı için bir dezavantajdır. Fakat değişikliklere açık olmaları ile ve polimerizasyon kabiliyetleri ile doku mühendisliğinde kullanımları için avantajalı bir konuma sahiptirler. [46], [47].



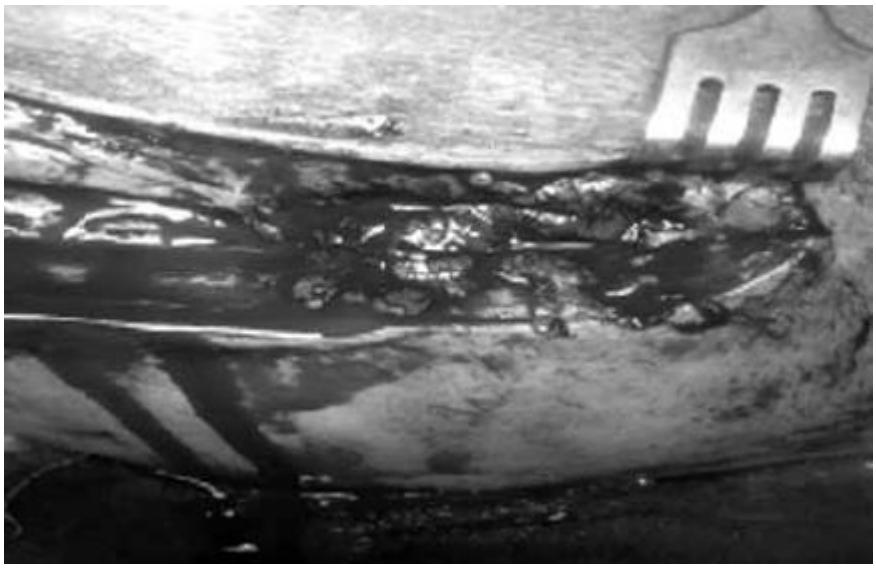
Şekil 2.6 Hyaluronik asidin yapısı. Kimyasal modifikasyonlar genellikle (a) ve (b)'de gerçekleştirilir [48].

Hyaluronik asit, ekstrasellüler matriks içerisinde ana element olarak bulunan bir glikozaminoglikandır (Şekil 2.6). Hyaluronik asit hidrofilik'tir ve bu sayede doku mühendisliğinde önemli bir avantaj olan biyobozunurluk ve biyouyumluluk özellikleri yüksektir [48].

2.2.2 Sentetik Biyomalzemeler

Sentetik biyomalzemeler üç ana başlık altında metalik biyomalzemeler, seramikler ve polimerler olarak incelenebilir.

Metalik biyomalzemeler, yaygın olarak kullanılan biyomalzeme türüdür. Hastalık tedavilerinde ve kemik kırıklarında yaygın şekilde kullanılır. Mekanik özelliklere mükemmel derece iyi cevap verirler. Kristal yapıları ve güçlü metalik bağları mekanik gereksinimler için avantajlı bir yapı sağlar. Fakat dokuya uyumları konusunda aynı şeyleri söylemek mümkün değildir. Sert yapıları doku ile olan uyumlarını etkiler ve neredeyse yok eder. Kullanımlarını sınırlayan bu özelliklere ek olarak korozyon dayanımlarının düşük olması ve alerjik bir karakterdedirler. Bu nedenle kemik doku mühendisliğinde kullanımları oldukça azdır. (Şekil 2.7) [49].



Şekil 2. 7. Metal üzerine metal total kalça protezi sonrası oluşan metallozisin makroskopik görünümü [49].

Korozyon, oksijen, hidroksit ve diğer bileşikleri oluştuğu, metal malzemelerin vücut sıvıları ve dokuları ile kimyasal tepkimelere yol açan şekilde bozunması ile oluşur. Oluşan korozyon sonucunda biyomalzemelerin mekanik özellikleri zayıflar ve toksisite meydana gelir. Metalik malzemelerin mükemmel derece iyi mekanik özelliklerine rağmen vücut içerisinde kullanımından önce korozyon deneylerinin yapılması gerekmektedir [50].

Metalik biyomalzemelerin kullanım alanları sadece kemik doku ile sınırlı değildir. Diş implantı olarak ve kalp damar cerrahisinde de kullanım alanları vardır. Paslanmaz çelikler, titanyum ve titanyum alaşımları, altın, nikel, tantal, magnezyum ve kobalt örnek olarak gösterilebilir. Vanadyum çeliği paslanmaz çelik özellikleri gösteren bir malzemedir ve kemik doku mühendisliği uygulamaların kırıkların iyileşme sürecinde kullanılan ilk metalik biyomalzemedir. ASTM 316L, günümüzde uygulamalarda kullanılan paslanmaz çeliktir. Paslanmaz çelikler, kalça çivisi ve vida olarak; kullanımı tercih edilen, kolay ulaşılması, ekonomik nedenlerle kullanımı yaygın olan ayrıca tercih edilen bir biyomalzemedir [51].

1930'lu yıllarda, titanyum, biyomalzeme olarak kullanılmaya başlamıştır. Fakat bulunması ve biyomalzeme olarak kullanıma hazırlanması oldukça güç bir malzemedir. Dezavantajlarına rağmen kimyasal ve fiziksel özellik bakımında oldukça avantajlı bir karakterdedir. Korozyona uğrama oranı düşüktür ve

biyouyumluluğu yüksektir. Ayrıca metalik biyomalzemelere göre hafiftir. Bu gibi avantajlarının yanı sıra titanyumun manyetik özelliği sayesinde manyetik rezonans uygulamaları için oldukça elverişlidir. Kemiklerin kırıklarında ve hastalıklarının tedavilerinde yaygın olarak kullanılır. Tüm bu özelliklerinin yanında kemik doku ile iyi derecede bağlanabilme özelliğine de sahiptir [50].

Kobalt, kemik doku mühendisliği için tek başına kullanılmaz. Bu nedenle kobalt-krom-molibden alaşımı ve kobalt-nikelkrom-molibden alaşımı üretilir ve bu halde kullanılır. Kobalt alaşımlarından diş malzemesi olarak ve sentetik eklem üretiminde faydalanılır.

Altın ve alaşımları, uzun ömürlü olma ve korozyona karşı yüksek direnç gösterme kabiliyetlerine sahiptirler. Yaygın olarak kullanımları diş hekimliğindedir. [52].

Tantalın mekanik ve fiziksel özellikleri, yüksektir. Diğer metalik biyomalzemelere göre avantajlı bir konumdadır. Gözeneklilik oranı ve yük taşıma kapasiteleri yüksektir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneyler sonucunda görülmüştür ki tantal biyouyumlu bir karakteristiğe sahiptir. [53], [54]. Tantalın, gözenekli yapısı sayesinde, yeni kullanılmaya başlanılmış bir materyal olmasına rağmen, yapılan araştırmalar ve testler sonucunda, kullanılan biyomalzemelere rakip bir malzeme olarak gösterilir [55], [56].

Ortopedik bir uygulamada ilk metalik uygulama 20. yüzyılda başarıyla gerçekleştirilmiştir, bu uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler paslanmaz çelik ve kobalt-krom esaslı alaşımlardır. 1940'larda ve 1960'larda, örneğin Ni ve Ti alaşımları ve nihayetinde NiTi alaşımları gibi yeni alaşım malzemeleri ortaya çıkmaya başlamıştır. Gelişleri, benzersiz mekanik ve kimyasal özellikleri nedeniyle ortopedik alanda biyomalzemelerde yeni bir uygulama yelpazesi yaratmıştır [31].

Ortopedide kullanılan metallerin biyoaktif olmamaları ile bilinirler ve biyoaktivite özelliklerini elde edebilmek için iki yaklaşım kullanılır. Birincisi seramik kaplamadır. İmplant yüzeyinin HA veya Hidroksiapatit gibi biyoaktif bir seramik ile kapalanır. İkincisi metal yüzeyi kimyasal olarak değiştirmekle yapılır. Proteinleri ve hücre yapışmasını ve diğer doku veya malzeme etkileşimlerini indüklemek amacı ile yapılır. HA plazma püskürtmesi yaygın olarak kullanılır. HA'ın soğuk metal üzerine plazma halinde yansıtılması ile yapılır. Biyolojik olarak parçalanan metaller arasında çinko, magnezyum ve demir bulunur [31].

Tablo 2. 2. Bioseramikler [82].

			Mekanik Özellikler			Fiziksel özellikler
			Youngs Modülü (Gpa)	Basma Dayanımı (Mpa)	Gerilme Dayanımı (Mpa)	
Bioseramikler	Bioinert	Alümina	380	4500	380	Yoğunluk 3,94 g/cm^3, tane büyüklüğü <4 µm
		Zirkonya	200	2000	500	Yoğunluk 6,09 g/cm3, tane büyüklüğü 0,2-0,4 µm
		Titanya	110	485	760	Yoğunluk 4,23 g/cm3
		Karbon/KNT	28	517	560	Yoğunluk 2,26 g/cm3, tane büyüklüğü 3-4 µm
	Bio-emilebilir	Gözenekli BCP	-	100	3	Sadece sinterlenmiş TCP+HA osteoindüktiftir.
		Tri-CaP	117	896	193	Ethanol ve suda çözünmez, Nitrik asitte çözünür.
		Kalsiyum karbonat	69,9	6	23,3	Suda az olsa da çözünür.
	Bioaktif	Cam Seramikleri	35	500	83	Sert ve kırılgandır. Yoğunluk 2,5 g/cm^3
		HA	120	1000	300	Kemiğe benzer. Yük taşımayan uygulamalarda kullanılır.

Biyoseramik malzemelerin kemiklerin ikame malzemesi olarak kullanılması biyomalzeme endüstrisindeki en önemli gelişmelerden biridir. Biyoseramik malzemeler iki sınıfa ayrılır. Kalsiyum fosfat içeren biyomalzemeler'le ve biyoaktif cam'lar bu iki grubun adıdır. Yapay kemik greftlerin yerine otuz yılı geçmiş bir süredir kasiyum fosfat seramikleri kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat seramikleri kemiklerin sahip olduğu inorganik bileşim ile benzerlik gösterir. Hidroksiapatit kristalleri (HA), oktakalsiyum fosfat, kalsiyum fosfat, α-trikalsiyum fosfat (α-TCP) ve β-trikalsiyum fosfat (β-TCP) örnek olarak verilebilir [57]. Biyoseramikler ve biyoseramiklerin özellikleri Tablo 2. 2.'de sunulmuştur.

Kalsiyum fosfat birleşeni olan hidroksiapatit, ihtiyaca göre şekil verilebilen aynı zamanda uygun kıvamda üretilebilen bir biyomalzemedir. HA'nın osteokondüktif özelliği yüksektir. Bir diğer avantaj olarak kemik morfojenik proteinine bağlanması kolaydır. Fakat degredesyon süresinin fazla olması nedeni ile diğer malzemeler ile birlikte kullanımı tercih edilir. [58]. Betα-trikalsiyum fosfat (β-TCP), kemik doku mühendisliği çalışmalarında, en çok incelenen biyoseramik malzemedir. Biyoseramiklerin üretim yöntemi olarak dökme, granül, toz veya kaplama formları kullanılabilir [57].

Yapılan birçok hücre canlılığı çalışmasında, β-TCP mükemmel derecede biyouyumluluk ve osteokondüktivite özellikleri göstermiştir. Bununla birlikte mezenkimal hücrelerin değişiklik göstermesini ve üremesini sağlayan bir özelliktedir [59], [62]. β-TCP, osteoindüktiviteyi destkleyen çabuk şekilde biyobozunma özelliğine ve yeni kemik oluşumunun hızlanması için gerekli olan yüksek afinite özellikleri gösterir. Ayrıca β-TCP, serum proteinleri için yüksek absorpsiyon kapasiteleri ile de başka malzemelere karşı avantaj sağlar [63].

β-TCP gözenekli yapıda ya da toz formunda kullanıma uygun hale getirilir. Kemiğe dönüşen hücreler, biyoseramik malzemenin gözeneklerinde uygun ortamda çoğaldığı için gözenekli implant malzemeler yapı iskeleti olarak görev alırlar [64].

Değişen konsantrasyonlarda, silikon dioksit, disodyum oksit, kalsiyum dioksit ve pirofosfat bir araya gelmesi sonucunda biyoaktif cam malzemesi oluşturulur. Biyoaktif camların doku ile girdiği etkileşimler sonucunda rezorbe özelliği, malzemenin çeşidine göre değişiklik gösterir. Biyoaktif camlar osteokondüktif ve osteoindüktif yapıdadır. Diş hekimliği alanında yaygın olarak kullanılır. [65], [66].

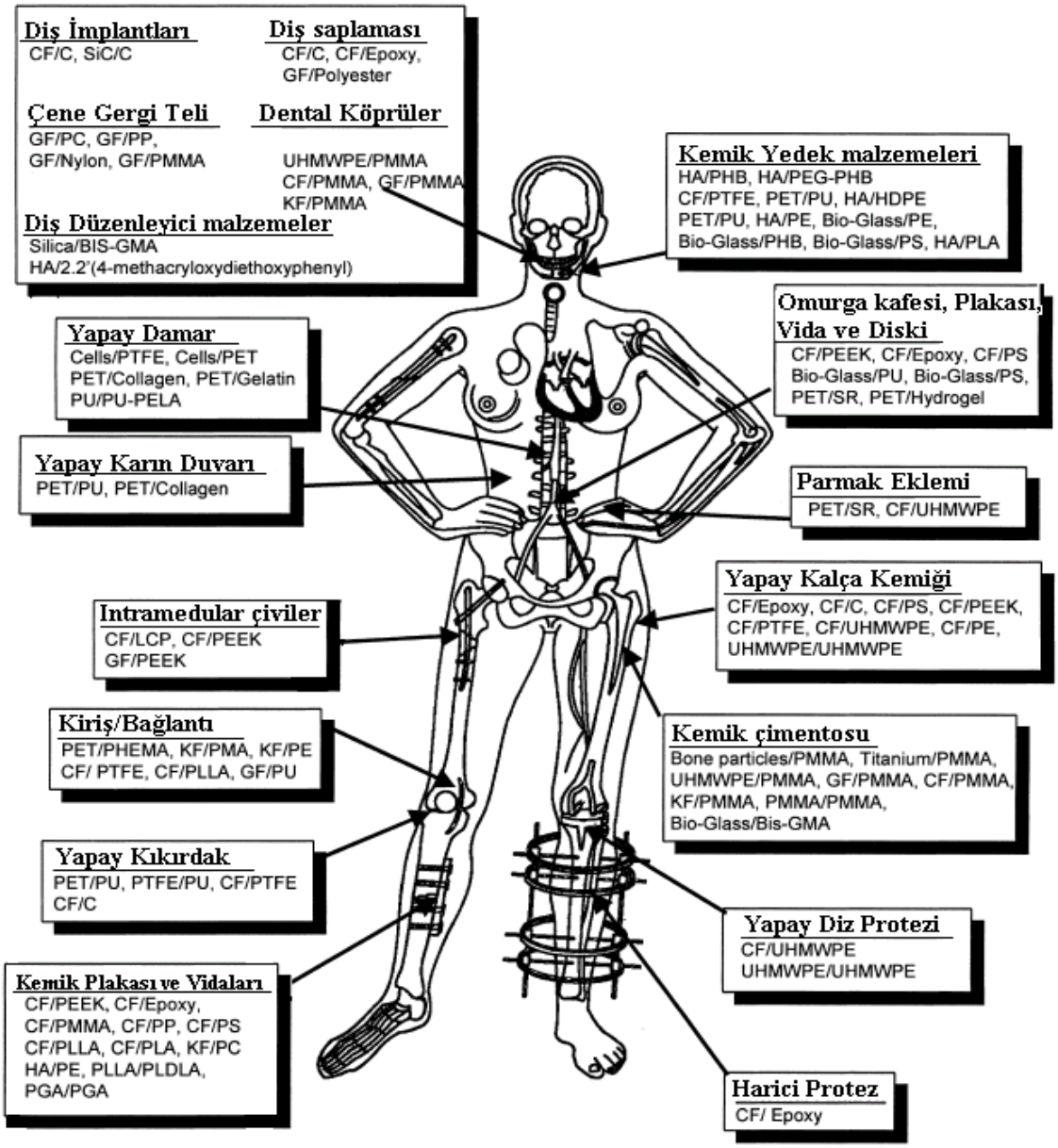
Birinci nesil seramikler, alümina, zirkonya ve diğer gözenekli seramiklerden oluşur. Seramiklerin kullanım amacı biyouyumluluk özellikleri ve dayanıklılık özellikleridir. Aşınma dirençleri çok yüksektir. Ortopedik uygulamalarda bazı seramik uygulamaları, kalça protezleri için biyoseramiklerin ve polietilen kaplarla birlikte kullanılacak femur başları veya alümina üzerinde alümina kullanıldığında asetabular kaplar olarak kullanımını içerir [31].

Biyoaktif cam, cam seramikler ve kalsiyum fosfatlar (CaP'ler) yaygın olarak kullanılır. Bu seramiklerin uygulamaları 1970'lerde başlamış ve daha çok kemik defekti dolgusu olarak kullanılmıştır. Biyoaktif seramiklerin biyouyumlu ve osteokondüktif oldukları yapılan çalışmalar neticesinde kanıtlanmıştır, örnek olarak silikon kemik oluşumunda önemli bir role sahiptirler, Si apatitlerle birlikte çekirdeklenmeyi ve kemiğe bağlanma materyalinin oluşumunu sağlarlar [31].

Sentetik polimeler, ihtiyaca göre kimyasal ve mekanik olarak istenilen şekilde ve özellikte üretilebildiği için doğal biyomalzemelerle kıyaslandığında daha güvenlidir. Bu nedenle polimer malzemeler kemik doku çalışmalarında yaygın olarak tercih edilir ve uygulama alanları geniştir. Sentetik polimerlerin işlenebilir bir yapıya sahip olması nedeni ile fiziksel ve mekanik özelliklerine ek olarak ihtiyaç

duyulan degredesyon süresinin de ayarlanabilmesine olanak sağlar. Ayrıca polimer malzemeye fonksiyonel gruplar (karboksil, hidroksil, amino vb.) veya peptit dizileri (integrin/heparin bağlayıcı peptitler) katılması ile malzemenin üzerine hücre yapışmasının desteklenmesini sağlar. Ayrıca poliesterler, poliüretanlar, polianhidritler ve polifumaratlar sentetik polimelerin yapıları içerisinde bulunurlar [67].

Polilaktik asit (PLA) ve çeşitleri, poliglikolik asit (PGA), poli laktik-coglikolik asit (PLGA), poli-kaprolakton (PCL) sentetik poliesterlerdir. Bu poliesterler bilinen ve yaygın olarak üzerinde deney yapılan malzemelerdir. Doğal yapıda bulunan patates, şeker ve mısır gibi malzemelerin monomerlerinden sentezlenirler. PLA, biyopolimer olarak adlandırılır. PLA'nın farklı yapıları: poli 1-laktik asit(PLLA), poli d-laktik asit(PDLA) ve poli 1, d-laktik asit(PLDLA) vb. gibi sıralanabilir [68]. PLA'nın çevre dostu yapısı ve biyouyumluluk özelliklerine rağmen, kırılganlık, hidrofobiklik ve yavaş biyobozunma gibi dezavantajları ile bilinir [69]. PLA'nın sahip olduğu fiziksel, termal ve mekanik özellikleri iyileştirmek amacı ile PCL ile birleştirilerek ortopedik uygulamalarda ve kemik doku mühendisliğinde kullanılır.



Şekil 2. 8. Ortopedide kullanılan kompozitler ve kullanım yerleri [18]

PLLA ve PCL, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'den onay almış biyomalzemelerdir. Hücre çalışmaları sonucunda kemik doku mühendisliği uygulamalarında negatif bir etkiye sebebiyet vereden kullanılabildiği kanıtlanan PCL, 1930'lardan beri kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmıştır [70]. PCL biyouyumluluk özelliğinin yanında, hidrofobik özellik taşır. PCL yarı kristalize bir yapıdadır. Memelilerin sahip olduğu enzimler nedeni ile PCL'nin bozulmasına olanak sağlamaz fakat bakteriler ve mantarlar PCL bozunması için uygun ortam yaratarak PCL'nin bozunmasına olanak sağlarlar. PCL'nin bozunması

enzimlerin varlığının yanı sıra polimerin uzunluğuna da bağlıdır. Ayrıca PCL'nin molekül ağırlığı da bozunmaya etki eder [70], [71].

Poliüretanlar (PUR), özellikleri nedeni ile biyomalzeme olarak kullanıma uygun, sert ve kararlı polimerlerdir [72].

Polianhidritler, biyouyumluluk özelliklerine ek olarak bozunabilme özellikleri nedeniyle de yaygın olarak araştırılan bir biyopolimer malzemedir. Polianhidritlerin ideal polimerler olarak sınıflandırılmalarının nedeni yüzey aşındırma özellikleridir. Bu özellikleri ile ilaç verme uygulamalarında görev alırlar. Mekanik olarak zayıf özelliklere sahip olmaları nedeni ile ortopedik alanda kullanımları mevcut değildir. Poli karboksifenoksi propan-sebasik asit(PCPP-SA) çok sayıda çalışmada incelenmiştir, PCPP-SA hızla çözünebilen, toksisite özellikleri iyi ve biyouyumludur. PCPP-SA kontrollü ve lokalize bir ilaç dağıtım malzemesi olarak görev yapar ve FDA onaylıdır [73], [74].

Poli propilen fumarat(PPF), poli propilen fumarat-ko-etilen glikol(PPF ko-EG) ve oligo poli etilen glikol fumarat(OPF) fumarat bazlı polimerlerdir. Fiziksel ve kimyasal özellikleri ihtiyaca göre ayarlanabilir. PPF ise bu polimerler arasında en çok üzerinde deney yapılan malzemedir [75].

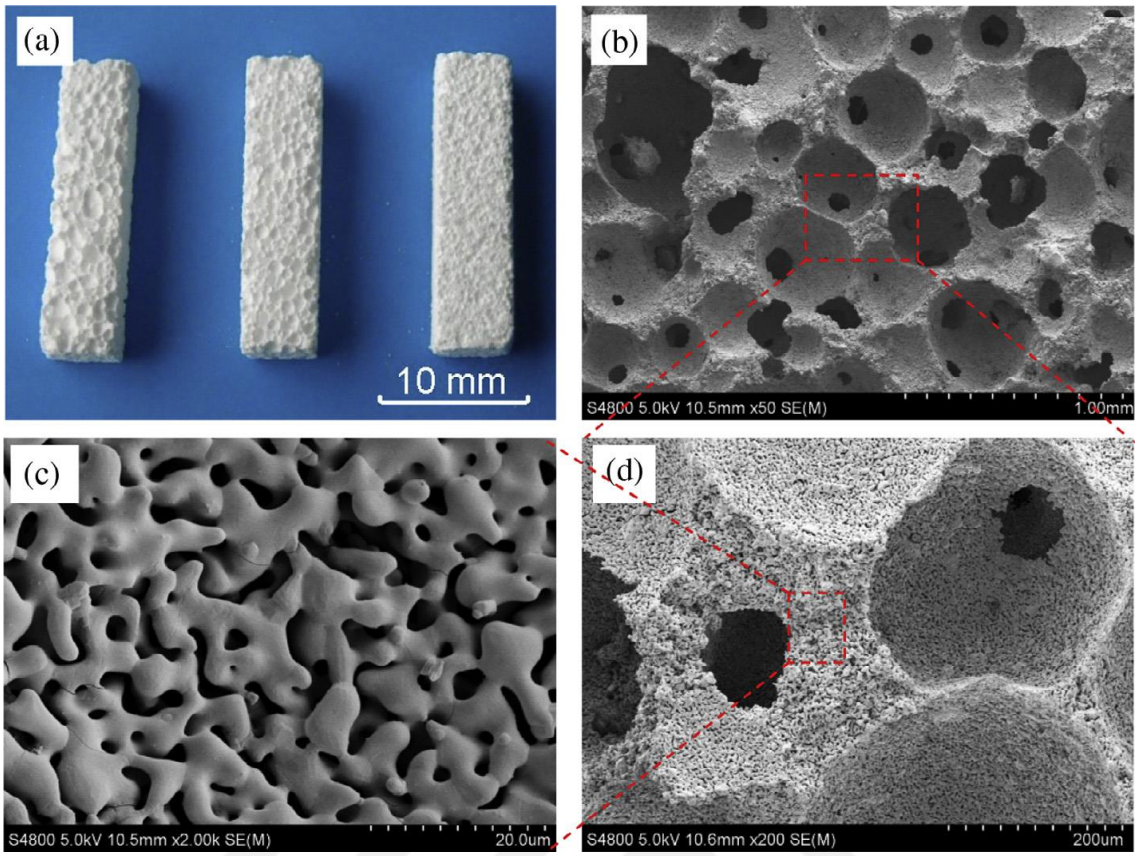
Birinci nesil polimerlere örnek olarak, polietilen, polimetil metakrilat, polipropilen, silikon ve poliüretanları verilebilir. Polimerler yapıları nedeni ile farklı özellikte malzemeler olarak kullanılabilirler. Polimerlerin bazı ortopedik uygulamaları, kalça protezlerinde asetabular kapların astarları için polietilen içeriğe sahiptir. Umut verici polimer olarak ultra yüksek moleküler ağırlıklı polietilen verilebilir. Bunun nedeni, bir polimer olarak benzersiz özellikleridir. Bu özellikler; yüksek darbe dayanımı, düşük yoğunluk, yüksek aşınma direnci ve biyouyumluluk olarak sıralanabilir. Ortopedide bir başka uygulama da küçük eklemlerin yerine silikon kullanılmasıdır. Bu tedavi özellikle romatoid artrit gibi durumlar için kullanılır. Son olarak, polimerlerin önemli bir ortopedik uygulaması, bir tür kemik çimentosu gibidir. Polimetil metakrilat en popüler malzemelerden birisirdir. Protezlerin sabitlenmesi için kullanılır. Bu materyalin dezavantajları, kullanmanın kemik çimentosunun büzülmesi ve zayıf bir biyolojik tepkiye neden olmasıdır [31].

İkinci nesil polimerler, kimyasal özelliklerin parçalanmasında ve polimer zincirlerinin emilmesinde kontrollü bir oran sergileyen yeniden emilebilir

polimerlerin geliştirilmesiyle tanımlanır. Biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak emilebilen polimer biyomalzemeler fikri 1960'larda tanıtılmıştır. Zaman geçtikçe ve teknoloji geliştikçe, son birkaç on yılda birçok diğer biyomalzemelerle birlikte birçok ortopedik uygulamada kullanılan malzemeler poliglikolid, polilaktid, polidioksanon, poli(ϵ-kaprolakton), polihidroksibütirat, poliortoester, kitosan, hyaluronik asit ve diğer hidrojeller. Bu malzemelerin kullanıldığı ortopedik uygulamalardan bazıları kemik ikamesi, kemik kırıklarının onarımı, kıkırdak, menisküs yırtıkları ve intervertebral disk sorunlarıdır [31].

2.2.3 Kalsiyum Fosfat Seramikler

Kalsiyum fosfat (CaP) seramikler, mükemmel biyouyumlulukları, biyoaktiviteleri, biyobozunurlukları, osteoindüktiviteleri ve osteoiletkenlikleri nedeniyle kemik dokusu mühendisliğinde yaygın olarak kullanılır. Son senelerde, CaP veya CaP bazlı kemik biyomalzemelerin kullanımı yaygınlaşmıştır [76]. CaP biyomalzemelerinin kemiğe inanılmaz derecede benzemesi ve biyoktiflikleri bu durumun nedenleri arasında baş sıradadır. CaP, kemik dokularını barındırmak için biyoaktiftir, yüzeylerinde in vivo olarak kemik benzeri apatit oluşturabilir. CaP ayrıca yeni kemik oluşumu için uygun bir iskele sağlar. CaP bazlı biyomalzemeler, bileşimler, fiziksel formlar (partiküller, bloklar, çimentolar, metal implant üzerindeki kaplamalar ve kompozitler) ve fizikokimyasal özellikler bakımından farklılık gösterir [77].



Şekil 2.9. BCP seramiklerinin morfolojisi ve mikro yapıları. (a) BCP seramiklerinin farklı gözenekli yapılarını gösterir. BCP seramiklerinin gözenekli yapıları cıva intrüzyon porozimetrisi ile test edilmiştir. Gözenekler soldan sağa sırasıyla %80 ± %5, %75 ± %5 ve %70 ± %5 ve ana gözenekler sırasıyla 500 ± 50 lm, 400 ± 30 lm, 300 ± 20 lm'dir. (b), (c) ve (d) gözenekli BCP seramiklerinin mikro yapılarıdır [76].

Hidroksiapatit (HA), betα-trikalsiyum fosfat (betα-TCP) ve bifazik CaP (BCP) seramikleri, kemik ikamesi olarak kullanılan malzemeler arasında en yaygın biçimde üzerinde çalışılan ve kullanılan malzemelerdir (Şekil 2.9) [76].

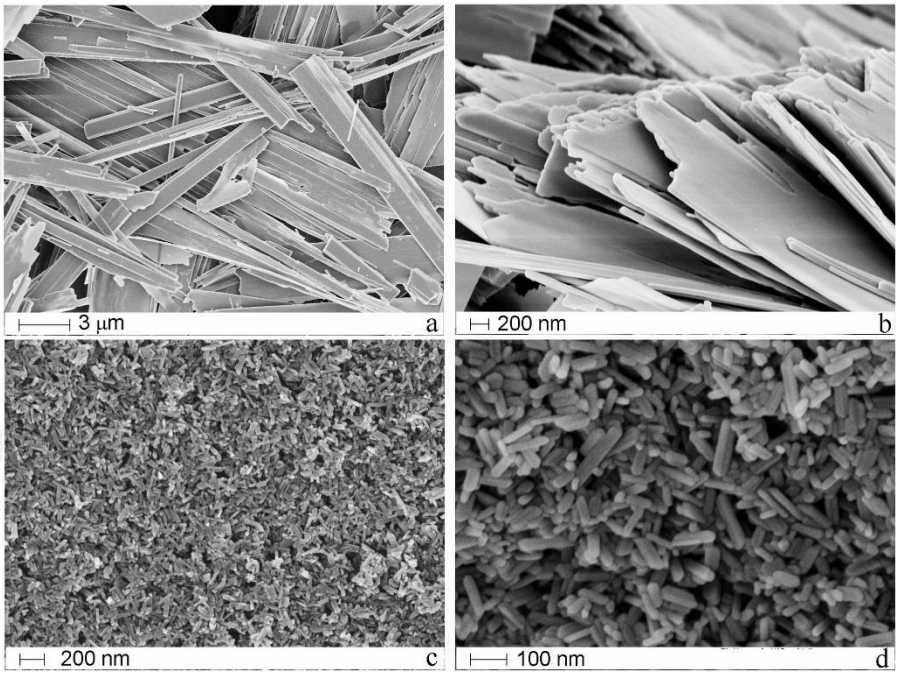
Kemik onarımı veya rejenerasyonu için bir materyal olarak, yalnızca uygun üç boyutlu geometriye sahip gözenekli CaP'nin dolaşımdaki endojen kemik morfogenetik proteinlerini bağlayabildiği, konsantre edebildiği ve osteoindüktif hale gelebildiği gözlenmiştir. Bu nedenle, üretim süreci olarak, CaP seramiklerinde birbirine bağlı gözeneklerin tanıtılması yer alır. Yüksek gözenekliliğe sahip birbirine bağlı gözenekli yapı, biyolojik özellikleri iyileştirirken, doku yenilenmesini de destekler. Gözenekli bir yapının hücre bağlanmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını desteklediği ve biyoakışkanlar için yollar sağladığı gösterilmiştir

[76]. Öte yandan, malzemeler genellikle gözenekliliğini arttırırken mekanik mukavemetini azaltır. Bu, yük taşıyan iskelelerin geliştirilmesinde gözenekli CaP için büyük bir zorluk teşkil etmektedir. Gözenekli CaP seramikleri uygun biyolojik özellikler gösterse de, zayıf mekanik özellikleri klinik uygulamalarını ciddi şekilde engeller [78]. Bu nedenle, mekanik ve biyolojik olarak avantajlı özelliklere sahip ve yük taşıyan fakat zarar görmüş kemiklerin onarımı için çok avantajlıdır [79].

Yapılan birçok çalışmada, CaP seramiklerinin mekanik özellikleri araştırılmıştır. Örneğin, mekanik mukavemeti arttırmak için gözenekliliğin azaltılması, takviye fazının dahil edilmesi vb. önerilmiştir [75]. Gözenekli yapının azaltılması ile biyolojik olarak dezavantajlar artabilir. Mekanik özellikleri iyileştirmek için polimerler katkı olarak kullanılabilir. Belirli biyouyumlu polimerlerle CaP, polilaktik asit (PLA), poli L-laktik asit(PLLA), poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), polikaprolakton (PCL) ve polietereterketon (PEEK) katkılandırılabilir. Bununla birlikte, seramik sinterleme işleminden kaynaklanan kısıtlamalar nedeniyle, önerilen CaP-polimer kompozitlerinin çoğu yalnızca kalıplama yöntemiyle sentezlenebilir. Polimer matrisine düşük hacimli CaP partiküllerinin eklenmesine izin veren polimer bazlı malzemeler oluşturulur [80]. Mekanik özellikler istenilen seviyeye bu şekilde çekilebilir fakat bu prosesler maliyet açısından dezavantajlıdır.

Hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfatlar (TCP), bifazik kalsiyum fosfatlar (BCP) ve bioglass (BG) gibi CaP kompozitlerinden oluşan kalsiyum fosfat (CaP) seramikler alloplastik greft materyalleri kapsamına girer. Farklı kemik büyütme prosedürleri ve ön ve iki aşamalı alveolar rekonstrüksiyonlar için (implant yerleştirme sırasında) başarıyla kullanılır [81]. CaP bazlı kemik greftleri, kalsiyum sülfat kemik greftine kıyasla daha yavaş bozunur. Biyobozunma, malzemenin kimyasal bileşimi, fiziksel özellikleri (yüzey alanı, gözeneklilik, yoğunluk, hacim) ve kristal yapısı, malzemenin pH stabilitesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır [82]. Hidroksiapatit (HA) ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi kalsiyum fosfat biyoseramikleri, HA ve TCP'nin iyi biyouyumluluk ve osteokondüktif özelliklere sahip olması nedeniyle kemik ikameleri için çok iyi bir malzemedir. Biyoseramiklerin kemik grefti ikameleri, ilaç dağıtım cihazları ve protein saflaştırma gibi birçok uygulaması vardır. Sentetik HA, doğal kemiklerin mineralize yapısı ile kimyasal benzerlikleri nedeniyle kemik ikamesidir [83].

HA, insan kemik ve diş dokularının ana ve tek inorganik bölümünü oluşturan, seyrek çözünür kalsiyum fosfat fazıdır. Şekil 2. 10.'da HA'nın SEM görüntüleri mevcuttur. HA, çoğu omurgalının yanı sıra insanlar ve diğer tüm memeliler tarafından endojen olarak sentezlendiğinden, biyomalzeme uygulamaları için kullanılan materyaller arasında biyouyumluluğun bir özetini sunmaktadır. HA'nın canlılar dünyasında her yerde bulunmasının bir sonucu, nispeten ılımlı biyolojik aktivitelere sahip olması şeklinde gelmektedir. Daha aktif biyomalzemeler arandığında, HA'ya kompozitlere dahil edilir ya da çeşitli fiziksel veya kimyasal prosedürlerle değiştirilir [84].

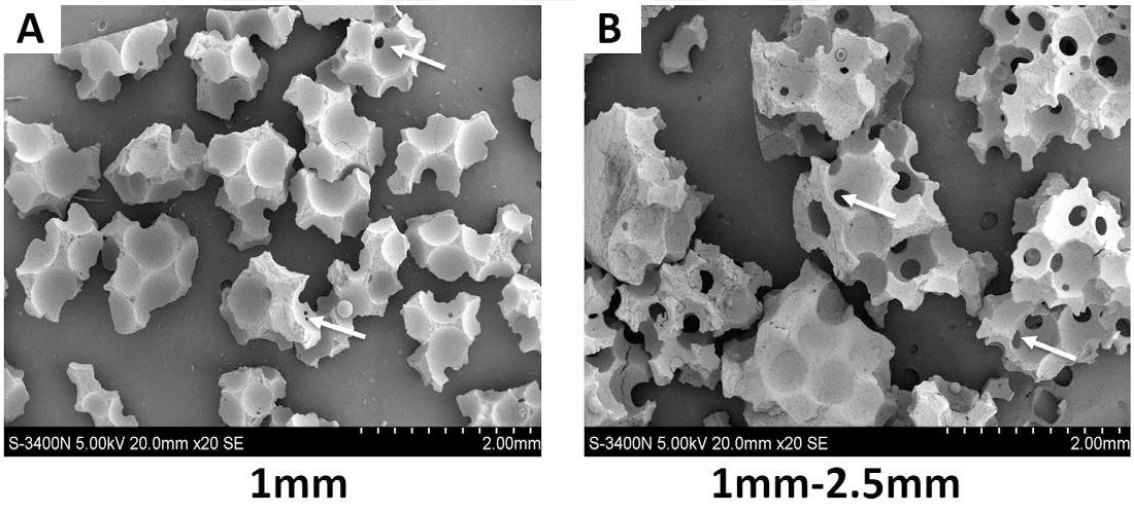


Şekil 2. 10. HAp (a–b) ve Ge-HAp'ın (c–d) SEM görüntüleri. Ölçek çubukları 3 μm (a), 200 nm (b, c) ve 100 nm'dir (d) [84].

HA'ın bir özelliği, nispeten yüksek yüklü kalsiyum ve fosfat iyonlarını birleştirebilen ve yüzeyi kaplayan hidratlı dağınık iyon kılıfına bağlanan hidroksil iyon kanalları tarafından oldukça kendine özgü bir şekilde geçebilen esnek kristal kafesidir. Bu yapısal etkilerin kombinasyonu, HA'yı kusurlara karşı istisnai bir toleransa ve dolayısıyla yabancı iyonların kolayca gerçekleştirilebilir bir katılımına yatkın hale getirir. Bu yabancı iyonlar, yapısal kalsiyum, fosfat ve bazen de hidroksil iyonlarının yerini alır ve ya yenileri ekler ya da önceden var olan özellikleri HA'ya ekler. Üretimlerinin nispi kolaylığı nedeniyle, bu tür ikame

edilmiş HA'lar, son birkaç on yılda, HA'yı belirli biyomedikal uygulamalar için daha etkili hale getirmek için ana akım bir strateji haline gelmiştir [84].

Saf HA, hücrelerin büyümesini sınırlayan ve uzun bir süre sonra deformitelere yol açabilen zayıf bir biyolojik parçalanabilirliğe sahiptir. β-TCP'nin biyolojik bozunması ve emilimi HA'nınkinden 10-20 kat daha hızlıdır [85]. TCP tabanlı kemik greftlerinin periodontal defektlerde uygulanması ilk olarak 1978'de Nery ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Malzeme, yapı ve bileşim olarak kemik mineraline yüksek benzerlik gösterir ve kullanılabilirliğinin yanı sıra mükemmel biyouyumluluk, manipülasyon kolaylığı ve depolama avantajları sağlar [81]. TCP malzemeleri (Şekil 2.11), hücresel ve vasküler bileşenlerin büyümesi için bir yapı iskelesi sağlayarak kemik rejenerasyonuna izin verir ve bozunma hızı, tamamen konakçı kemik ile değiştirilirken yeni kemik oluşumu ile aynı zamandadır [86]. Herhangi bir osteoindüktif materyal veya ek bariyer membran kullanılmadan kendiliğinden bile iyileşebilir [87].



Şekil 2.11. β-TCP granülleri için taramalı elektron mikroskobu sonuçları. Beyaz oklar ara bağlantıları temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 20× [85].

Özellikle β-TCP'nin biyolojik olarak stabil iken ve doku hacmini zamanla korurken, 24 ay sonra yeni kemikle tam ikameye sahip olabilir. İnsan klinik çalışmalarından elde edilen bulgular, kemik altı kusurlarının TCP materyalleri ile tedavisinin, önemli klinik ataşman seviyesi (CAL) kazanımları ile önemli problama cep derinliği (PPD) ve kemikli azalmaların derinliği ile sonuçlanabileceğini ortaya

koyar. Bu klinik sonuçlar periodontal rejenerasyonu takiben on yıla kadar korunduğunu gösterir [81].

Histolojik olarak TCP, diğer materyaller ve teknikler gibi biraz tahmin edilemez olsa da gerçek periodontal rejenerasyonun iyi kanıtlarını gösterir [88]. Bununla birlikte, β-TCP'nin kemik altı defektlerindeki osteojenik potansiyeli, insan histolojisi ile doğrulanır [89]. Bu bağlamda, kalsiyum fosfat (CaP), osteojenik farklılaşmayı teşvik etmek için uygun bir matris gibi görünür. Bu, esas olarak, CaP yüzeylerinin mezenkimal kök hücreleri osteoblastlara yönlendirebildiği, örneğin osteojenik büyüme faktörleri gibi osteoindüktif maddeler eklenmeden kemik rejenerasyonu fikrini destekleyen ex-vivo deneylerinde gösterilir [81].

TCP'nin bilinen üç polimorfu: düşük sıcaklıklı β-TCP ve yüksek sıcaklıklı formlar α- ve α'-TCP. α'-TCP pratik uygulamalar için uygun olmamakla birlikte, sadece 1430 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bulunur. Geçiş sıcaklığının altında soğutulduğunda ise α-TCP'ye dönüşümü gerçekleşir. Buna karşılık, β-TCP oda sıcaklığında stabildir ve yaklaşık 1125 °C'de oda sıcaklığına soğutma sırasında tutulabilen α-TCP fazına dönüşür [90]. Bununla birlikte, β-'den α-TCP'ye faz geçişi tersine çevrilebilir olduğundan, numunenin soğutulması sırasında oluşan β-TCP ikincil fazı olmadan saf α-TCP'nin sentezi için termal söndürme genellikle gereklidir. Hem α- hem de β-TCP polimorflarının sentezlenmesi, uygun Ca/P molar oranına (1.5:1) sahip bir öncünün ısıl işlemiyle meydana gelir. β-TCP tozları ise yaklaşık 800 °C veya daha yüksek sıcaklıklarda katı hal reaksiyonu veya ıslak çökeltme yöntemleri kullanılarak da üretilebilir [91]. α-TCP sentezi için ise en yaygın olarak kullanım, kristalin β-TCP'nin 1125°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda termal dönüşümü ile meydana getirilmesidir [92]. Bununla birlikte, α-TCP, 600-700 °C gibi düşük sıcaklıklarda amorf CP'den sentezlenebilir ve yaklaşık 900 °C'de β-TCP'ye daha fazla dönüşüm gerçekleştirilebilir [93]. β-TCP'nin sentezlenme sıcaklığının altında ve β-TCP'nin α-TCP'ye geçiş sıcaklığının üzerinde, düşük ve yüksek sıcaklıklarda α-TCP sentezlenmesi gerçekleştirilebilir. α ve β-TCP sırasıyla monoklinik ve rhombohedral kristal sistemlerinde kristalleşme özelliği gösterir. Teorik yoğunluklar α TCP için 2,866 g/cm^{-3} ve β-TCP için 3,066 g/cm^{-3}'tür. α- ve β-polimorfları arasındaki bu yapısal farklılıklar, çözünürlük ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi farklı kimyasal ve biyolojik özelliklerinden sorumludur. α-

TCP'nin çözünürlüğü daha yüksektir, ayrıca sulu çözeltilerde β-TCP'den çok daha reaktiftir ve kemik hidroksiapatitine benzer kalsiyum eksikliği olan hidroksiapatit oluşumu ile kolayca hidrolize gerçekleşir. TCP polimorflarının kimyasal özelliklerindeki bu farklılıklar, onların farklı pratik uygulamalarını tanımlar. α-TCP, çeşitli kemik çimentolarının ana toz bileşeni olarak yaygın şekilde kullanılırken, β-TCP, mono- veya bifazik biyoseramiklerin ve kompozitlerin önemli bir bileşenidir [94], [95]. Malzemeler kemik büyümesini destekleyen ve fibroblastların, osteoblastların ve diğer kemik hücrelerinin proliferasyonunu destekleyen özeliktedirler [91].

HA fizyolojik koşullar altında en kararlı faz olarak bilinirken α ve β-TCP insan vücudunda daha fazla emilebilir. Bifazik CaP (BCP) olarak bilinen çözünür faz (β-TCP) ile daha kararlı bir fazın (HA) kombinasyonu, BCP malzemelerinin biyolojik özelliklerini optimize etmeyi mümkün kılar. Hidroksiapatit (HA) ve diğer kalsiyum fosfatlardan (CP'ler) oluşan sentetik bifazik biyoseramikler, kemik defektlerinin tedavisinde hızlı çözünmesine bağlı olarak umut verici verimlilik sağlayabilir [81]. Son zamanlarda HA, α ve β-TCP'den oluşan trifazik CaP'nin hazırlanmasına yönelik bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu kombinasyon, BCP malzemelerine kıyasla gelişmiş biyoaktivite ve kemik rejenerasyon yeteneği sağlamak için büyük bir potansiyele sahiptir. Biyoaktivite üzerinde daha iyi bir kontrole ve CaP yapı iskelelerinin biyolojik bozunmasına izin veren üç fazlı CaP malzemelerinde daha çözünür α-TCP fazının varlığının, orada in vitro biyoaktiviteyi önemli ölçüde arttırdığı bilinir [96].

2.3 Mangan, Temel Özellikleri ve İnsan Vücuduna Etkileri

Çalışma içerisinde, kemik doku mühendisliğinde kullanılan β-TCP'nin mekanik özelliklerini iyileştirmek için Mn kullanılmıştır. β-TCP ve Mn tozları (Şekil 2.12) karıştırıldıktan sonra sinterlenmiş ve kompozit malzeme oluşturularak incelenmiştir. Mn tercih edilmesinin temel sebebi protein sentezi için gerekli olan temel bir element olması ve β-TCP ile oluşturacağı bir kompozit malzemede mekanik özellikleri olumlu yönde etkileyebilecek karaktere sahip olmasıdır.

2.3.1 Temel Özellikleri

Mn (CAS-7439-96-5), yerkabuğunda yaklaşık %0,1 içeren en bol bulunan 12. element ve en bol bulunan 5. metaldir. Kimyasal sembolü Mn olup, atom numarası

25, ortalama atom kütlesi 54.94 g mol 1, atom yarıçapı 1.7A° ve kaynama noktası 1962 olan gümüş grisi, kırılgan ve parlak bir geçiş metalidir.

Mangan toprak, su ve kayalıklarda doğal olarak bulunan bir element olmasına karşın baz metal olarak doğada bulunmamaktadır. Yüzün üzerinde mineralle bileşik yapabilen bu element ayrıca yerkabuğunun %0.1'inde de bulunmaktadır. Atmosferik manganın temel kaynağı da yerkabuğudur. Yerkabuğunu hareketlendirmekte olan depremler, okyanus olayları, volkanik patlamalar ve yangınlar ile bitki örtüsü de atmosferik manganın doğal kaynaklarıdır [97], [98].



Şekil 2. 12. Manganın genel görünümü [99]

2.3.2 İnsan Vücuduna Etkileri

Mangan (Mn) dahil tüm metallerin çevresel kaynakları hem doğal hem de antropojenik olabilir. Çoğu toksik metal, düşük bileşimlerda bile çevreye salındığında birikecek ve uzun bir süre boyunca canlı organizmalar üzerinde toksik etkilerini gösterecektir. Çevreye salınan eser metallerin toksisitesinin, diğer tüm radyoaktif ve organik kirleticilerin toplamından daha fazla olduğuna inanılır. Sürekli bilimsel ilerleme ve endüstriyel süreçler, çevreye sürekli olarak yeni kimyasalların girmesine neden olur ve sonuç olarak, bu tür bileşiklerin kısa ve uzun vadeli çevresel ve sağlık risk faktörlerinin ve etkilerinin anlaşılması ve değerlendirilmesi zorunludur [7].

Mn katkılı malzemelerin kullanımı sürekli olarak artmasına rağmen, manganın doğaya karşı uzun vadeli etkileri hakkında bilinen sonuçları sınırlıdır. Ayrıca, Mn'nin hem eksikliği hem de fazlalığı zararlı sağlık etkilerine sahiptir. Önemli olarak, en yaygın olarak inhalasyon veya yutma yoluyla aşırı Mn alımı, merkezi

sinir sistemi (CNS) patolojisine neden olabilir [7]. Bunların yanı sıra, Mangan (Mn), sinir sisteminin normal çalışması için gerekli olan temel bir mikro besindir. Manganizm olarak da bilinen nörotoksik etkilere yol açan metal alımının artması, ilk kez Couper (1837) tarafından metale aşırı işle ilgili maruziyeti olan işçilerde tanımlanır. Özellikle madenciler, dökümhaneler ve alaşım endüstrisinde çalışan işçilerde Mn'ye mesleki maruziyet vakaları olduğu saptanmıştır [7].

Mn, kemik dokularında protein sentezi için gerekli olan, kemikte ortalama 1,7-3 ppm bileşima sahip bir eser elementtir. Mn iyonlarının integrini aktive ederek osteoblast adezyonu, canlılığı ve proliferasyonuna fayda sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, Mn iyonları içeren çok işlevli materyallerde osteojenik gen ekspresyonunda artış ve yüksek kollajen birikim hızı gözlenir. Son zamanlarda, Mn iyonlarının, osteojenik farklılaşmayı teşvik etme ve kemik kütlesini koruma yetenekleri nedeniyle kemik rejenerasyonunu iyileştirmenin bir yolu olduğu düşünülür. Ek olarak, yumurtalıkları alınmış sıçanlarda Mn takviyesi kemik yoğunluğunu ve kemik oluşumunu arttırır ve kemik kaybını engeller, bu da Mn takviyesinin osteoporoz için bir tedavi olabileceğini düşündürür [100]. Mn, Glikosiltransferaz enzimi için temel bir kofaktördür ve hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesi için önemlidir [9]. Ayrıca, Mn'nin in vivo (sıçan modelinde) kemik mineral yoğunluğunda bir artışa neden olduğu bulunmuştur [10]. Mn ayrıca aminoasitlerin, kolesterolün ve karbonhidratların metabolizmasında rol oynar, üreme, sinir ve bağışıklık sistemlerinin sağlığını korumaya yardımcı olur ve kan şekeri regülasyonu, kan pıhtılaşması, kıkırdak oluşumu ve eklemlerde yağlanma sıvısı oluşumlarında rol oynar [7].

Mn yüksek dozlarda kullanıldığında toksisiteye yol açabileceğinden dikkatli önlemler gereklidir. Parkinson hastalığına benzer nörodejeneratif bozuklukları indükleyebilir [9]. Sinir sistemimiz yüksek mangan alımından olumsuz etkilenebilirken, eksikliğine bağlı olarak iskelet bozuklukları, kısırlık, kalp rahatsızlıkları, hipertansiyon ve değişmiş-bozulmuş lipid ve karbonhidrat metabolizması gibi çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilir [7]. Mn eksikliğinin kas distorsiyonuna neden olabilir [10]; ek olarak iskelet deformiteleri ve testis disfonksiyonu da ortaya çıkabilir [11].

3
DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada, kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik β-TCP türevi seramik esaslı kompozit malzemelerin morfolojik özellikleri, mekanik performansı ve in vitro biyolojik tepkisi incelenmiştir.

3.1 Deneylerde Kullanılan Malzemeler ve Özellikleri

β-TCP (medyan partikül boyutu: 4 μm) ve Mn tozları (medyan partikül boyutu: 44 μm) sırasıyla Merck ve Nanokar Nanotechnology'den satın alınmıştır.

3.2 Numunelerin Hazırlanması

β-TCP-Mangan kompozitlerinin üretimi için, saf β-TCP ve ağırlıkça %0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ve %1 Mn içeren beş farklı Mn+β-TCP karışımından oluşan altı farklı numune hazırlandı. Numunelerin bileşimleri ve numune kodları Tablo 3.1'de verilmiştir. Karışımlar ilk önce bir RETSCH-S100 karıştırma makinesi kullanılarak etanol içinde bilyeler bulunan öğütme kabında 240 dakika 180 dev/dk'da homojenleştirildi, daha sonra 150 °C'de 2 saat Nabertherm LHT 02/17 marka sinterleme fırınında kurutuldu.

Tablo 3. 1. Karışımların kodları ve ağırlıkça oranları

Numune kodu	β-TCP (ağ.%)	Mn (ağ.%)
$S_{0.00}$	100	0.00
$S_{0.01}$	99.99	0.01
$S_{0.05}$	99.95	0.05
$S_{0.10}$	99.90	0.10
$S_{0.50}$	99.50	0.50
$S_{1.00}$	99.00	1.00



Şekil 3. 1. RETSH-S100 marka değirmen, öğütme kabı

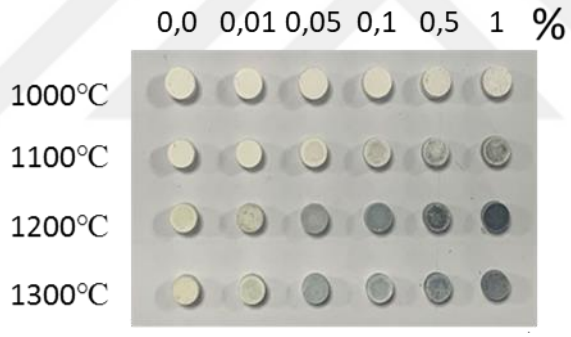
Silindirik peletler, saf (β-TCP) tozu ve Mn katkılı (Mn+β-TCP) tozların 350 MPa'da paslanmaz çelik kalıplarda preslenmesiyle üretildi. S0.00, S0.01, S0.05, S0.10, S0.50 ve S1.00 numune kodlarında mekanik testler ve in vitro testler için sırasıyla 11 mm/11 mm ve 11 mm/2 mm çap/yükseklik oranına sahip peletler hazırlandı. 6 grup olmak üzere 4 farklı sıcaklıkta sinterlenmek üzere 10x4x6=240 adet pelet hazırlandı. Hazırlanan peletlerin yoğunluk, mikrosertlik, basma dayanımı ve mikroyapı analizleri yapıldı. Basma dayanımı testi sonucu parçalanmış olan numuneler tekrar toz haline getirilerek numunelerin XRD ve FTIR analizleri yapıldı. Son olarak, peletler (her numune grubundan) bir Nabertherm LHT 02/17 fırını kullanılarak 1000, 1100, 1200 ve 1300°C'lik dört farklı sıcaklıkta 4 saat boyunca Nabertherm LHT 02/17 marka sinterleme fırınında sinterlendi.



Şekil 3. 2. Basma çelik kalıplar ve Presleme cihazı



Şekil 3. 3. Nabertherm LHT 02/17 marka sinterleme fırını



Şekil 3. 4. Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş pelet numuneler

3.3 Deneysel Çalışmalar

Deneysel çalışmalar ana hatlarıyla yoğunluk, mikroyapı ve yapı analizi, mekanik testler ve in vitro biyolojik testler şeklinde üç aşamada gerçekleştirildi.

3.3.1 Yoğunluk, Mikroyapı ve Yapı Analizi

Sinterlenmiş seramik esaslı kompozit peletlerin yığın yoğunluğu, klasik hidrostatik ağırlıklandırma yöntemi ile değerlendirildi. Sonuçlar, her numune grubundan beş ayrı numunenin test edilmesine dayalı olarak aritmetik ortalamalar $\pm$ standart sapmalar olarak tez içerisinde sunuldu. Numune mikroyapısı, 10 kV hızlanma voltajında ve 8 – 11 mm çalışma mesafesinde ikincil elektron modunda çalıştırılan

bir Zeiss MA/EVO 10 cihazı kullanılarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile araştırıldı.



Şekil 3. 5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Seramik esaslı kompozit malzemelerin kimyasal yapısı, Romanya Ulusal Malzeme Fiziği Enstitüsünde, ZnSe/Elmas Kristali ile bir Pike-MIRacle ATR kafası (Φ1.8 mm) ile donatılmış bir Perkin Elmer Spectrum BX II spektrometresi kullanılarak zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) modunda Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ile araştırıldı. FTIR-ATR spektrumları 2000 – 500 cm^{-1} aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte elde edildi.

Kristal faz tanımlaması, Cu Ka (λ=1.5418 Å) radyasyonlu bir Bruker D8 Advance kırınım ölçer kullanılarak Bragg-Brentano modunda X-ışını kırınımı ile gerçekleştirildi. XRD desenleri 2θ=15–45° aralığında ve 0.02°'lik bir adım boyutuyla kaydedildi. Faz bileşimi ve ortalama kristalit boyutları, TOPAS v3 yazılımı ile gerçekleştirilen Rietveld analizi ile çıkarıldı.

3.3.2 Mekanik Testler

Vickers mikro sertlik (HV) testleri Shimadzu HMV-2 cihazı ile 200 g yükte ve 20 s bekleme süresinde gerçekleştirildi. Bu analizler, her bir numune üzerinde 8 ayrı ölçüm yapılarak üçlü numuneler üzerinde yapıldı. Daha sonra aritmetik ortalamalar ve standart sapma değerleri hesaplandı.

Basma dayanımının ve elastisite modülünün ölçümü için bir Devotrans DVT ekipmanı kullanıldı. 2 mm/dak'lık bir yer değiştirme hızı kullanıldı. Bu analizler, her bir numune grubundan 5 numune üzerinde gerçekleştirildi. Daha sonra aritmetik ortalamalar ve standart sapma değerleri hesaplandı.



Şekil 3. 6. MV Shimadzu mikrosertlik test cihazı



Şekil 3. 7. Devotrans DVT basma test cihazı

3.3.3 In Vitro Biyolojik Testler

Hücre kültürü çalışmaları, Atılım Üniversitesi'nden (Ankara, Türkiye) sağlanan MC3T3-E1 ATCC CRL 2593 fare osteoblast hücre hattı üzerinde gerçekleştirildi. 1000°C sıcaklıkta sinterlenen β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit malzemelerin

sito-uyumluluğu, hem tozda (100 µg/mL toz kütle/hücre kültürü ortamı hacmi kullanılarak) hem de peletlenmiş formda, dolayısıyla farklı mikroyapıye sahip numuneler üzerinde test edildi. Bu numune gruplarının her ikisi de UV altında 45 dakika sterilize edildi. Toz numuneler 96 oyuklu plakalara, silindirik peletler ise 24 oyuklu plakalara yerleştirildi. Deneylerde kullanılan malzemelerin tamamı Amresco, Solon, ABD'den satın alınmıştır. Peletler üzerine hücre ekim şartları; 3 x 10^3 hücre/mL'lik hücre yoğunluğu ve büyüme ortamı olarak %10 v/v fetal sığır serumu (FBS), 1%v/v L glutamin ve 1%v/v penisilin/streptomisin antibiyotik solüsyonu kullanılmıştır. Örnekler homeostatik koşullar altında (37 °C, %5 CO_2, nemlendirilmiş ortam) 21 güne kadar inkübe edildi. Deneylerin kontrolü, doku kültürü dereceli polistiren flasklarda oluşturuldu.

Hücre canlılığı/çoğalması, 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) tahlili ile test edildi. Kalsiyum birikimini belirlemek için Alizarin Kırmızısı boyama yapılırken, hücre farklılaşmasını araştırmak için Alkalin Fosfatlar (ALP) aktivitesi çkarıldı. β-TCP bazlı kompakt peletler üzerine ekilen hücrelerin yapışması ve mikroyapısı, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi.

MTT tahlilleri, 1, 7, 14 ve 21 günlük hücre kültürlenmesinden sonra yapıldı. İnkübasyondan sonra, büyüme ortamı çıkarıldı ve örnekler, fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu (Amresco, Solon, ABD) ile üç kez durulandı. Durulama işleminden sonra 24 oyuklu plakalardaki numuneler, 90 µL taze ortam ve 10 µL MTT solüsyonu (Sigmα-Aldrich, ABD) içeren yeni bir 96 oyuklu plakaya aktarıldı. 96 oyuklu plaklardaki örnekler için aynı işlem 90 µL taze besiyerinde uygulandı ve 10 µL MTT solüsyonu eklendi. Kuyu plakalarına MTT çözeltisinin eklenmesinden sonra, tüm numuneler 3 saat daha inkübe edildi. Ek inkübasyon süresi sona erdiğinde, MTT solüsyonu atıldı ve formazan kristallerini çözmek için 200 µL dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigmα-Aldrich, ABD) eklendi. Yine, tüm numuneler 1 saat daha inkübe edildi. Son olarak kuyulardan besiyeri alınarak solüsyonların absorbans değerleri Dynamica LEDETECT96 mikroplaka okuyucu ile 540 nm'de ölçüldü.

β-TCP tabanlı silindirik peletler üzerinde büyütülen hücrelerin mikroyapısını incelemek için SEM görüntüleme yapıldı. Mikrograflar, 7 ve 21 günlük kültürden sonra kaydedildi. Bu amaçla inkübatörden örnekler alındı ve üreme ortamı atıldı.

Numuneler üç kez PBS ile yıkandı. Hücreleri sabitlemek için oyuklara %10 formalin solüsyonu ilave edildi ve daha sonra oda sıcaklığında 20 dakika karanlıkta tutuldu. Daha sonra formalin solüsyonu atıldı ve hücreler tekrar üç kez PBS ile yıkandı. Daha sonra numuneler, her biri 2 dakika boyunca bir dizi etanol solüsyonu (%30 – 100) ile durulanmıştır. Numuneler daha sonra dikkatli bir şekilde 24 oyuklu yeni bir plakaya aktarıldı ve 5 dakika boyunca %100 heksametildisilizan çözeltisi ile işlendi. Son olarak, her numune SEM tutuculara sabitlendi ve 2500x ve 5000x büyütmelerde görüntülenen ince Au-Pt filmleri ile kaplandı.

ALP aktivitesi, ekimin 7., 14. ve 21. günlerinde incelendi. Substrat çözeltisini oluşturmak için bir nitro mavi tetrazolyum ve 5-bromo-4kloro-3-indolil fosfat (NBT/BCIP) tableti (Sigma Aldrich, ABD) 10 mL dH2O içinde çözüldü. Daha sonra hazırlanan solüsyon 2 saat oda sıcaklığında karanlıkta tutuldu. Kültüre alınan örnekler inkübatörden çıkarıldıktan sonra büyüme ortamı atıldı ve hücreler üç kez PBS ile yıkandı. Örneklere %10 formalin solüsyonu eklendi ve hücrelerin fiksasyonu için 1 dakika bekletildi. Daha sonra formalin solüsyonu atıldı ve hücreler tekrar üç kez PBS ile yıkandı. Son olarak, kuyucuklara substrat solüsyonu ilave edildi, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ve ölçümler Dynamica LEDETECT96 mikroplaka okuyucu kullanılarak 405 nm'de gerçekleştirildi.

Yetiştirmenin 7., 14. ve 21. gününden sonra, pelet numunelere ekilen hücrelerde kalsiyum birikiminin karakterizasyonu için Alizarin Kırmızı boyama testi (Sigmα-Aldrich, ABD) yapıldı. Boyama solüsyonunu elde etmek için 2 g Alizarin Red boyası 10 mL deiyonize su (dH2O) içinde çözündürüldü ve nihai pH, HCl ile 4.1 4.3'e ayarlandı. Nihai çözelti, kullanılana kadar karanlıkta saklandı. İnkübasyondan sonra (%5 CO2, 37 °C), kültür ortamı çıkarıldı ve örnekler PBS solüsyonu ile yıkandı. Hücrelerin fiksasyonu %10 formalin ilavesi ile yapıldı ve örnekler 30 dakika karanlıkta tutuldu. Ayrıca formalin dikkatlice atıldı ve hücreler arıtılmış su (dH_2O) ile yıkandı. Daha sonra oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta tutulan numunelerin üzerine leke solüsyonu ilave edildi. Daha sonra numuneler 200 dev/dk hızında santrifüj edildi. Son olarak, kalsiyum birikimi/mineralizasyon seviyesini karakterize etmek için solüsyonların absorbans değerleri Dynamica LEDETECT96 mikroplaka okuyucu ile 405 nm'de ölçüldü.

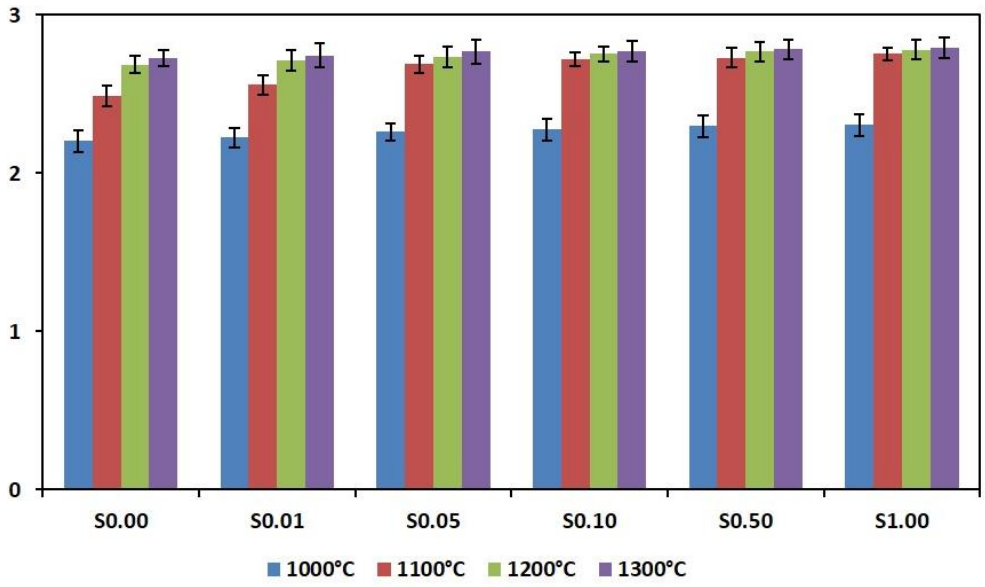
4
DENEYSEL BULGU VE TARTIŞMA

Çalışmada β-TCP ve Mn tozları karışımları oluşturularak farklı derecelerde sinterlenmiş ve mekanik özellikleri, in vitro özellikleri araştırılmıştır. Mekanik, fiziksel ve mikroyapı özellikleri değerlendirilerek optimum sinterleme sıcaklığı ve kompozit bileşimi belirlenmiştir.

4.1 Yoğunluk Analizi

1000°C'de sinterleme işlemine uğrayan seramik esaslı kompozit malzemeler diğer sıcaklıklara göre düşük yoğunlaşma gözlenirken, Mn içeriğinden bağımsız olarak

yaklaşık 2,2 – 2,3 g/cm^3 aralığında yoğunluk değerleri bulundu. Ağırlıkça %0.01'den fazla Mn içeren β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit malzemeler başta olmak üzere, 1100°C sinterlemeden sonra tüm numuneler için önemli bir yoğunluk artışı fark edildi. Seramik esaslı kompozit malzemelerin yoğunluğunun 1200°C'de daha da arttığı ve 1300 °C'de sadece küçük değişiklikler yaşandığı görüldü. Mn katkısından bağımsız olarak 1200°C'den sonra önemli bir yoğunlaşma değişikliği meydana gelmedi. 1300 °C'de sinterlenmiş ağırlıkça %0.05 Mn katkılı numunelerde yaklaşık 2.77 g/cm^3'lük en yüksek yoğunluk değerine ulaşıldığı gözlemlenmiştir. β-TCP'nin nispi yoğunluğunun 3.03 ile 3.14 g/cm^3 arasında değiştiği bilinir ve sıklıkla 3.07 g/cm^3'e yakın olduğu tespit edilmiştir [101], [102]. Ryu ve arkadaşları'nın [101] yaptığı deneylerde 1100 °C'de yapılan sinterleme işleminden sonra yoğunluğun arttığı gözlemlenmiştir. Turan ve arkadaşları [103] tarafından yapılan çalışmalarda da aynı sonuca ulaşılmıştır. Çalışmadaki kompozit malzemelerin youğunluk ölçümü sonuçları iki çalışma ile de uyumludur. Şekil 4.1, sinterleme sıcaklığı ile seramik esaslı kompozit malzemelerin yoğunluğunun gelişimini göstermektedir.

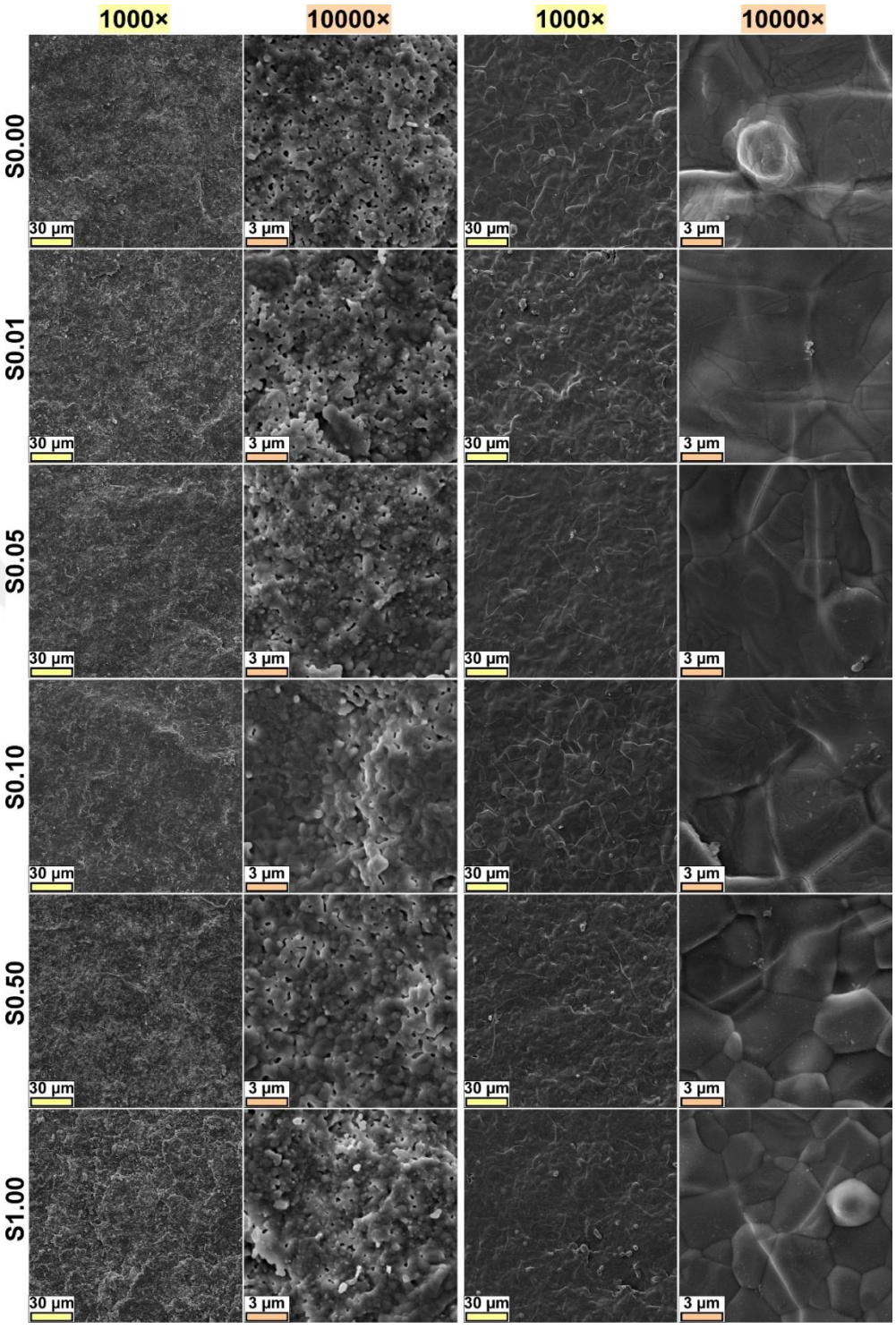


Şekil 4. 1. 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C sıcaklıklarda sinterlenen basit ve Mn katkılı β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit peletlerin yoğunluk değerleri (g/cm^3)

4.2 SEM Analizi

Mikroyapı analizi, 1000 ve 1300 °C'de sinterlenen β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit malzemeler için SEM cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 4.2). 1000 °C sinterlenmiş tüm numunelerde gözenekli yapılara rastlanmasına rağmen, ağırlıkça %0.05 ve %0.1 Mn katkılı β-TCP bazlı sinterlenmiş numunelerin diğerlerine göre daha az poroziteye sahip olduğu gözlemlendi. Daha yüksek yoğunluklar (sadece gözeneksiz veya sporadik gözenekli) ve daha büyük tane boyutları, daha yüksek sıcaklıklarda gözlendi. 1300°C'lik sinterleme ile 1000°C'de sinterlendiğinde daha küçük taneli bir gözenek popülasyonu sunan ağırlıkça %0.05 ve %0.1 Mn katkılı numunelerde saf β-TCP'ye göre daha büyük yaklaşık 10 – 25 μm boyutunda taneler elde edildi. Ağırlıkça %0.5 ve %1 Mn katkılı numuneler için daha düşük yaklaşık 2.5 – 8 μm tane boyutları gözlendi (Şekil 4.2 – 1000x mikrograflar)., daha yüksek sinterleme sıcaklıklarında tane büyümesinin, Döbelin ve arkadaşlarının [93] çalışmasında olduğu gibi arttığı gözlemlendi. Döbelin ve arkadaşlarının deneylerinde daha düşük sıcaklıklarda β-TCP'nin değerleri ve faz dönüşümleri de incelenmiştir [93].

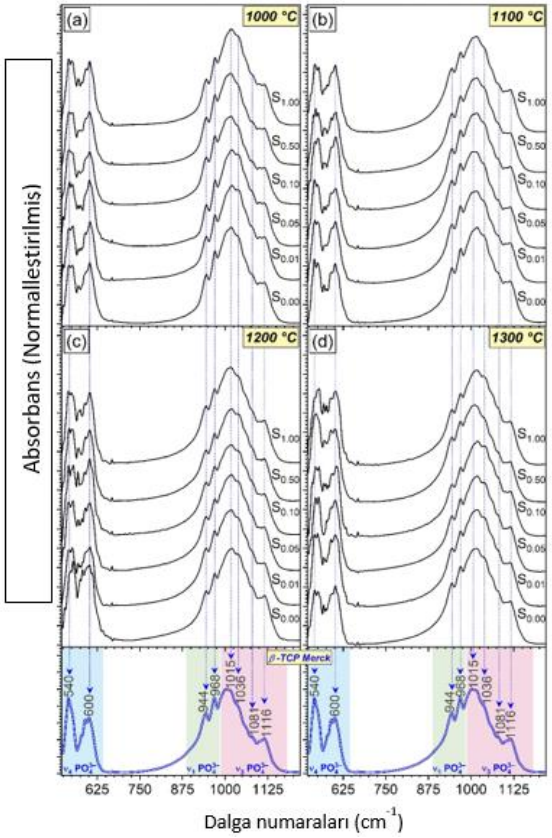
1000 °C **1300 °C**



Şekil 4. 2. 1000 °C ve 1300 °C'de sinterlenmiş β-TCP bazlı numunelerin SEM görüntüleri

4.3 FTIR-ATR Analizi

Bu çalışma çerçevesinde sentezlenen β-TCP bazlı seramiklerin FTIR-ATR spektrumları, bir kaynak β-TCP malzemesinin (Merck) IR spektrumu ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.3'te verilmiştir.

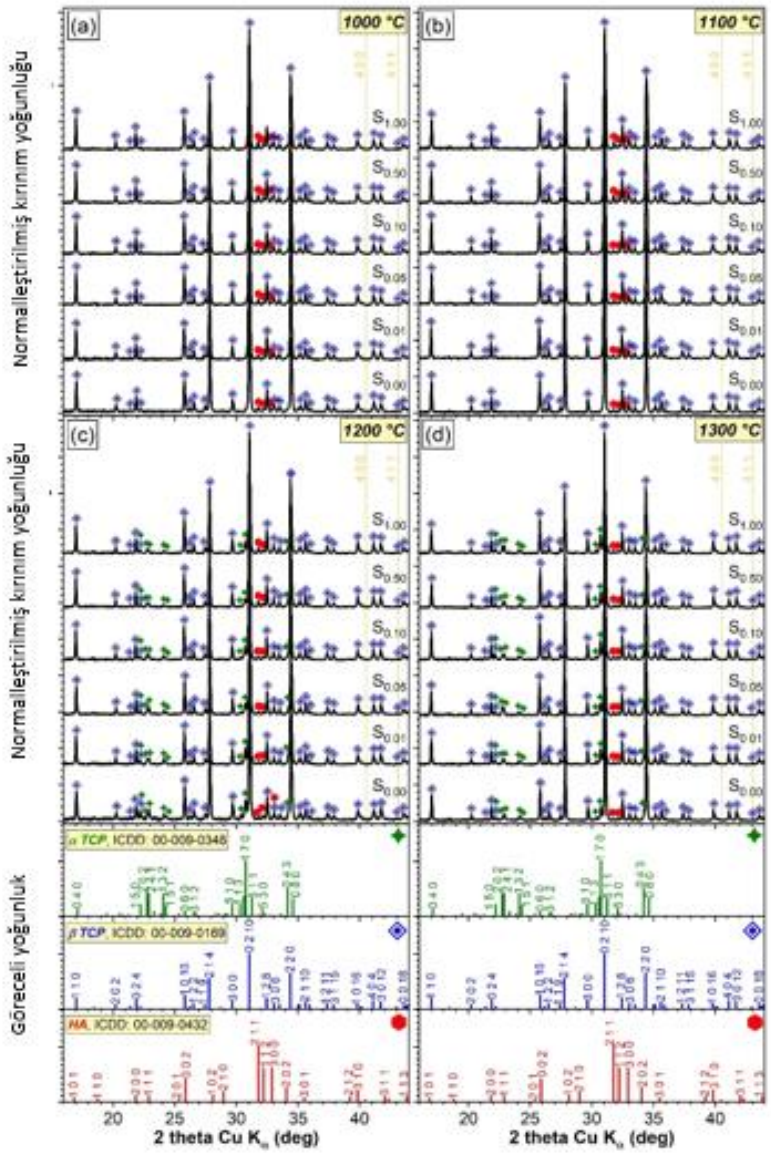


Şekil 4. 3. (a) 1000 °C, (b) 1100 °C, (c) 1200 °C ve (d) 1300 °C'de sinterlenmiş basit ve Mn katkılı β-TCP esaslı seramik esaslı kompozit malzemelerin FTIR-ATR spektrumları. Saf ticari β-TCP tozunun spektrumu (Merck, CAS no. 7758-87-4, saflık ≥%98) karşılaştırma için grafiklerin alt kısmında sunulmaktadır (mavi çizgi ile).

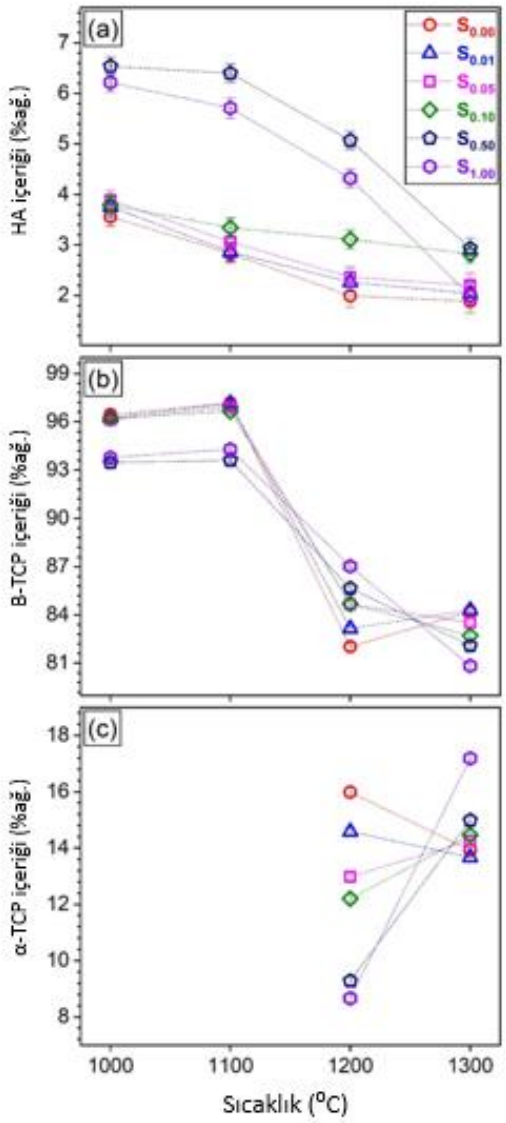
Tüm spektrumların, saf β-TCP kontrol malzemesine benzer spektral görünüme sahip olduğu tespit edilmiştir. β-TCP'nin ana kızılötesi karakteristik frekansları Şekil 4.3'de görüldüğü gibi 540 cm-1, 600 cm^{-1}, 944 cm^{-1}, 968 cm^{-1}, 1036 cm^{-1}, 1081 cm^{-1} ve 1116 cm^{-1}'dir [104], [105]. Bu piklerden 944 cm^{-1} ve 1116 cm^{-1}'deki pikler PO_4^{-3} için simetrik titreşim piklerini işaret eder. 540 cm-1 ve 600 cm^{-1} pikleri ise PO_4^{-3} için eğilme titreşim piklerine karşılık gelirken 1081 cm^{-1} piki PO_2 simetrik gerilme pikini gösterir. Kompozit malzemeler içerisinde β-TCP, sinterleme sıcaklığı ve Mn katkı oranları farklarına rağmen ana faz olduğu tesbit edildi. Test sonuçları ile β-TCP bileşiğine özgü tüm IR bantlarının varlığı kanıtlanmıştır.

4.4 XRD Analizi

β-TCP bazlı seramiklerin XRD analizleri, Şekil 4.4'te karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Ayrı bir Mn fazı gözlemlenmemesi, Mn'nin kristal kafese başarılı bir şekilde girdiğini göstermiştir. Rietveld analizi ile belirlenen her numunenin faz bileşimi Şekil 4.5'te verilmiştir. 1000 °C ve 1100°C'de sinterlenen numunelerin ana faz olarak ağırlıkça yaklaşık %94 – 96 oranında β-TCP'den ve %4 – 6 oranında HA'ten oluştuğu gözlemlenmiştir. Mn katkısı ile bu sıcaklık aralığında kayda değer bir faz bileşimi değişikliği kaydedilmemiştir. 1200°C ve 1300°C'de sinterlenen numunelerde β-TCP termal ayrışmasının kinetiğine göre, Jeong ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumlu olarak yaklaşık 1125°C'yi [106] aşan sıcaklıklarda, α-TCP'nin varlığı gözlemlenmiş ve α-TCP bileşimi ağırlıkça yaklaşık %8 – 17 olarak ölçülmüştür. Genel olarak, Mn katkısının, 1200 °C'de β-TCP'nin bozunma hızını azalttığı gözlemlenmiştir. Bu sıcaklığın üzerinde, Mn'nin β-TCP kafesi üzerindeki stabilizatör rolünün, termal β-TCP → α-TCP ayrışma kinetiği ile güçlendiği belirlendi. Beklendiği gibi, β-TCP'nin ortalama kristal boyutunun, 1000, 1100, 1200 ve 1300°C sıcaklıklarda sinterlenmesi ile yaklaşık 140-166 nm, 180-202, 150-195, 200-239 nm olarak aşamalı olarak arttığı söylenebilir. Benzer şekilde, α-TCP'nin ortalama kristal boyutunun sinterleme sıcaklığının 1200'den 1300 °C'ye artmasıyla yaklaşık 80 – 99'dan yaklaşık 86 – 129 nm'ye çıktığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 4. (a) 1000 °C, (b) 1100 °C, (c) 1200 °C ve (d) 1300 °C'de sinterlenmiş basit ve Mn katkılı β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit malzemelerin XRD desenleri. Altıgen HA (kırmızı), eşkenar dörtgen β-TCP (mavi) ve ortorombik α-TCP (yeşil) fazlarının ICDD referans dosyaları, grafiklerin alt kısmında çubuklar olarak karşılaştırma için temsil edilmektedir. Kübik Mn (ICDD: 04-004-9077) çizgileri grafiklerde sarı çizgiler olarak görüntülenir.



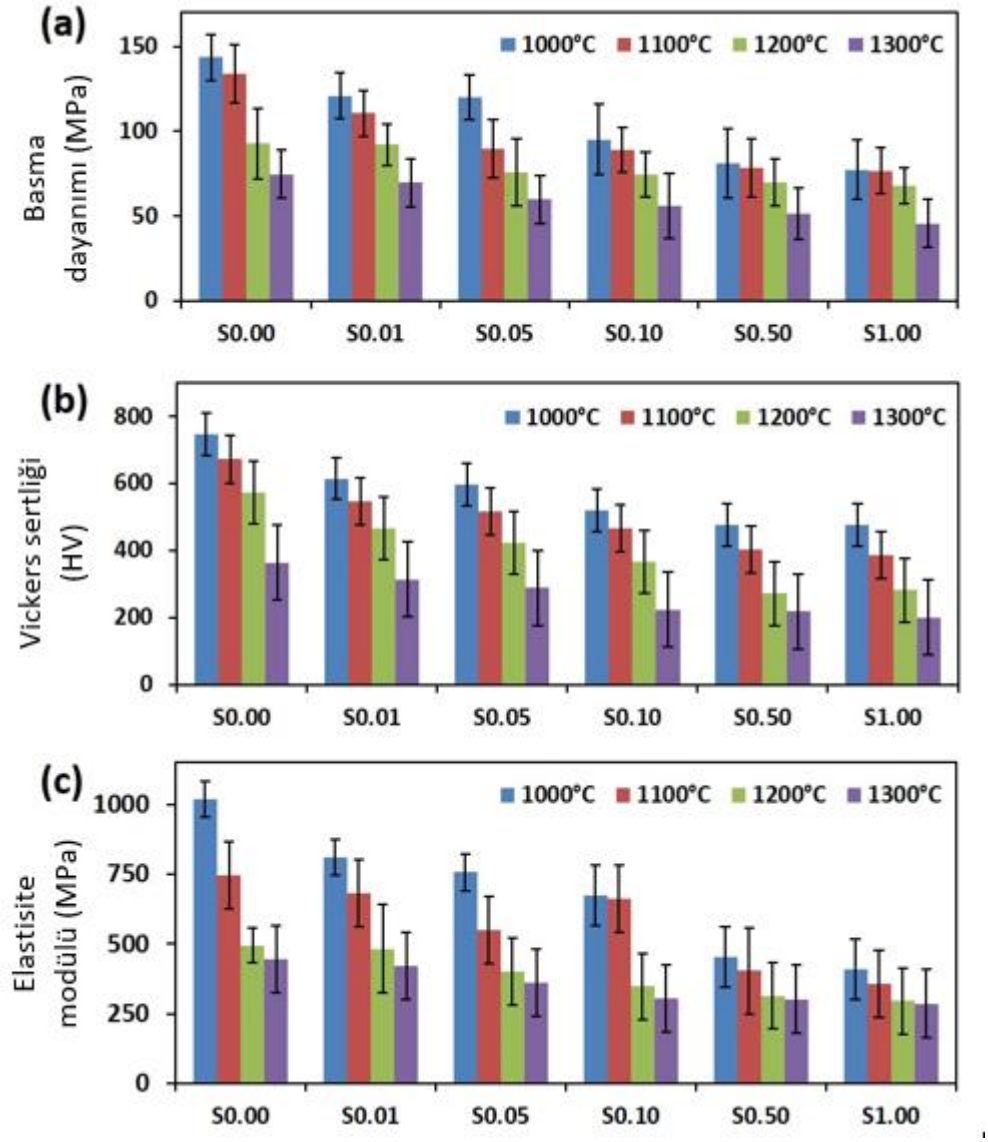
Şekil 4. 5. 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C'de sinterlenmiş basit ve Mn katkılı seramik esaslı kompozit malzemelerde faz bileşiminin, Rietveld analizi ile gelişimi

Tablo 4. 1. Karışımların kodları ve ağırlıkça oranları

Numune kodu	β-TCP (ağ.%)	Mn (ağ.%)
$S_{0.00}$	100	0.00
$S_{0.01}$	99.99	0.01
$S_{0.05}$	99.95	0.05
$S_{0.10}$	99.90	0.10
$S_{0.50}$	99.50	0.50
$S_{1.00}$	99.00	1.00

4.5 Mekanik Değerlerin Analizi

Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit malzemelerin mikrosertlik, basma dayanımı ve elastik modülünün gelişimi Şekil 4.6'da görülür. 1000°C ve 1100°C'de sinterlenen numuneler için daha yüksek basma dayanımı sonuçları (77 – 143 MPa) elde edilmiştir ve bu değerler Tian ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarında bulunan yaklaşık 95-99 MPa ile benzerdir [107].



Şekil 4. 6. Mekanik test sonuçları: (a) basma dayanımı; (b) Vickers sertliği ve (c) 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C'de sinterlenmiş β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit malzemelerin elastik modülü

Sinterleme sıcaklığının 1200°C ve 1300°C'ye yükselmesi, ağırlıkça %0.05'ten daha yüksek Mn katkılı numunelerin basma dayanımı değerlerinin sırasıyla yaklaşık 70 ve 60 MPa'ya düşmesine neden olduğu düşünülmektedir.

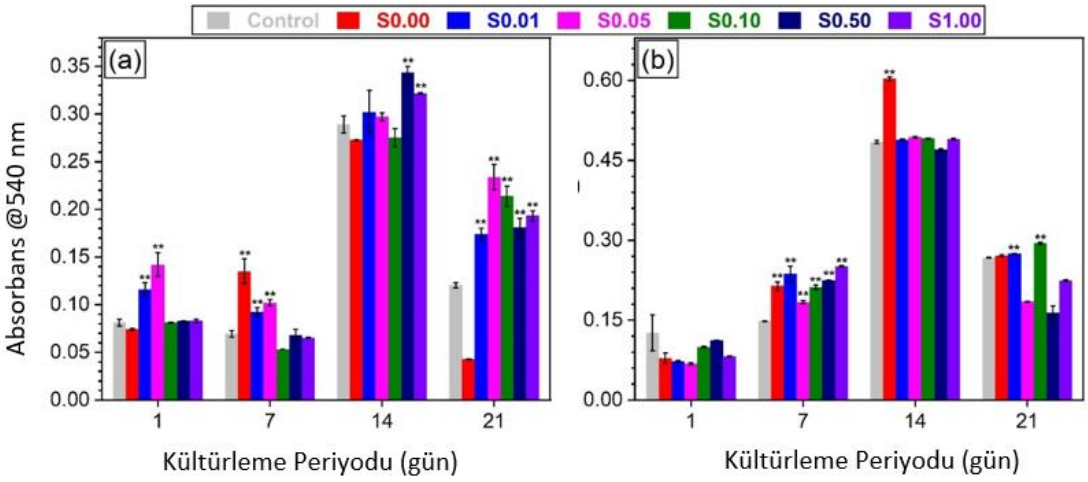
Seramiklerin sertlik değerleri 1000°C sinterlenen numuneler için daha yüksektir (1000 °C sinterlemeden sonra maksimum yaklaşık 745 HV sunan saf β-TCP hariç). Mn ağırlığı ve sinterleme sıcaklığındaki artışla birlikte mikrosertliğin azaldığı gözlemlenmiştir. Sertlik eğilimlerine benzer şekilde, 1000 ve 1100°C'de sinterlenen numunelerde genellikle daha yüksek elastik modül değerleri elde edilmiştir. Genel olarak, Mn ilavesi biyo-seramiklerin elastik modülünü azalmış ve en düşük elastisite modülü, en yüksek sinterleme sıcaklığında gözlemlenmiştir.

4.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları, Atılım Üniversitesi'nden (Ankara, Türkiye) sağlanan MC3T3-E1 ATCC CRL-2593 fare osteoblast hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir. 1000°C sıcaklıkta sinterlenen β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit malzemelerin sito-uyumluluğu, hem toz formdaki numunelerde (100 µg/mL toz kütle/hücre kültürü ortamı hacmi kullanılarak) hem de peletlenmiş formda, dolayısıyla farklı morfolojiye sahip numuneler üzerinde test edilmiştir.

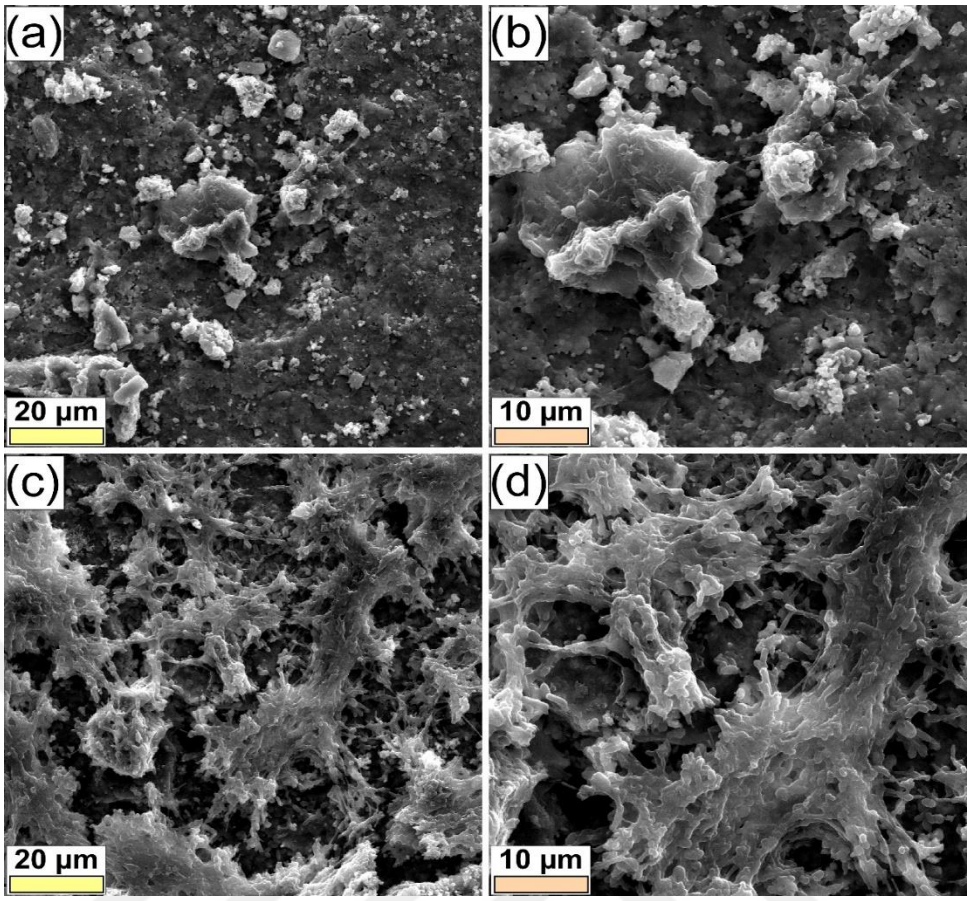
4.6.1 Metabolik Aktivite ve Canlılık

MC3T3-E1 hücrelerinin, sinterlenmiş peletlerin ve toz haline getirilmiş basit ve Mn katkılı β-TCP bazlı numunelerde, metabolik aktivitesi ve canlılığı araştırıldı. 1-21 gün arası incelenen numunelerin hiçbirinde sitotoksik etki kaydedilmedi (Şekil 4.7). 21. günde, tüm Mn katkılı β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit peletler saf β-TCP ile karşılaştırıldığında daha yüksek hücre canlılığı gösterdi ($p<0,01$) (Şekil 4.7a).



Şekil 4. 7. (a) silindirik peletler ve (b) toz numuneler biçiminde saf ve Mn katkılı β-TCP bazlı 1000°C sıcaklıkta sinterlenmiş seramik esaslı kompozit malzemelerin varlığında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar, sırasıyla < 0.05, 0.01, 0.001 ve 0.0001 p-değerlerini ifade eden '*','**', '***' ve '****' ile gösterilir.

Ek olarak, en yüksek hücre canlılığı, ağırlıkça %0.05 Mn katkılı sinterlenmiş silindirik β-TCP bazlı pelet tarafından sergilendi. Bu durumda, bu bileşimdeki Mn katkılı β-TCP bazlı biyo-seramiklerin osteoblast hücrelerinin gelişimi için uygun bir yüzey oluşturduğu varsayılabilir (Şekil 4.7a). Öte yandan, 21. günde, ağırlıkça %0,01 ve 0,1 Mn katkılı β-TCP toz numuneleri, dereceli polistren flasklarda hücre kültürü uygulaması ile elde edilen hücre canlılığı karşılaştırmasında pelet numune sonuçlarına benzer bir hücre canlılığı gösterdi ($p<0,01$) (Şekil 4.7a-b). Bu düşük Mn katkılı (bu durumda toz halinde) bir β-TCP'nin osteoblast hücreleri için uygun bir mikro ortam olarak hizmet edebileceğine dair ek bir ipucu sağlandı. SEM verilerine göre Mn katkılı β-TCP bazlı sinterlenmiş peletlerin tüm yüzeyleri osteoblast hücreleri ile kaplandı. S0.05 tipi numunelerde (Şekil 4.8) diğer bileşimdaki peletlere kıyasla daha yüksek bir hücre yoğunluğu, MTT sonuçlarıyla (Şekil 4.7a) iyi bir uyum içinde olduğu görüldü.



Şekil 4. 8. (a,b) 7 ve (c,d) 21 gün boyunca MC3T3-E1 hücreleri ile inkübe edilen S0.05 Mn katkılı β-TCP bazlı 1000°C sıcaklıkta sinterlenmiş peletlerin SEM görüntüleri. Büyütme: (a,c) 2500×; (b,d) 5000×

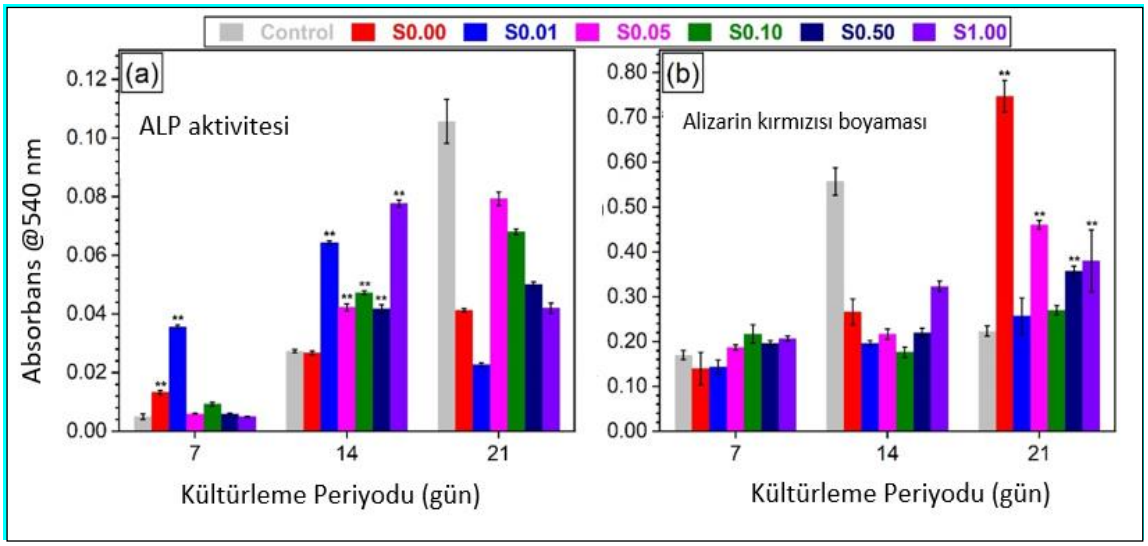
Mangan, hücre dışı matris proteinlerine hücrelerin yapışmasını etkilediği kabul edilen, insan vücudu için kritik bir rolü olan bilinen bir mikro besindir [108]. Mn'nin sitotoksisitesi ve arttırıcı etkileri doza bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında, Mn iyonları hücre canlılığını, proliferasyonunu ve farklılaşmasını iyileştirir [9], [15], [108], [109]. Torres ve ark [9] MC3T3-E1 osteoblast hücre kültürlerinde in vitro hücre testleri gerçekleştirmişler ve β-TCP'ye dahil edilen az bir Mn katkısı (%0,76 mol) kemik mineralizasyonunu hızlandırmada etkili olduğu kanıtlanmıştır. [9]. Lüthen ve arkadaşları iki değerli Mn katyonlarının 0,01 – 0,5 mM bileşim aralığında kaynak MnCl2 kullanarak MG-63 osteoblastik hücreler üzerindeki etkisini incelemişler [108] ve 0,1 mM MnCl2'den daha yüksek bileşimlerde hem alkalin fosfataz (ALP) hem de kollajen 1 (Col 1) mRNA'sının ekspresyonunun azaldığını belirtmişlerdir. Rau ve arkadaşları saf ve Mn katkılı β-

TCP'nin biyolojik özelliklerini test etmişlerdir (MnxCa3-x(PO4)2, x=0,001, 0,01 ve 0,1 ile) [15]. En düşük Mn katkılı β-TCP'nin, daha düşük miktarlarda Mn2+ liç ederek, adipoz türevli mezenkimal kök hücrelerin üç farklı fenotipe, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik, doğru en belirgin farklılaşmasını indükleyebildiğini gözlemlemişlerdir.

4.6.2 Osteoblastik ve Osteojenik Farklılaşma

Osteoblastik farklılaşma öncesi, inorganik fosfat birikimini ölçen bir ALP aktivite testi ile belirlendi. 7, 14 ve 21 günlük kültürden sonra saf ve Mn katkılı β-TCP bazlı sinterlenmiş peletlerin ALP aktivite sonuçları Şekil 9a'da gösteridi. Tüm β-TCP bazlı materyallerin doku kültürü, dereceli polistiren flasklardaki sonuçlarda biyolojik kontrol grubuna göre 14 gün sonra ALP aktivitesi açısından önemli bir ($p<0,01$) artış gösterdi. Ancak 21 gün sonraki sonuçlarda biyolojik kontrol grubu, saf ve Mn katkılı β-TCP bazlı peletlere kıyasla daha yüksek bir ALP aktivitesi sergiledi. Wu ve ark [14] ve Liu ve ark [81] tarafından yapılan çalışmalarda, Mn^{+2} katkılı kalsiyum fosfat malzemlerinin, daha iyi hücre adezyonu ve osteojenik maddelerin salgılanmasında artış gibi osteoblast yanıtını önemli ölçüde artırdığı tesbit edilmiştir.

Saf β-TCP ve Mn katkılı β-TCP bazlı seramik esaslı kompozit malzemelerin mineralizasyon kapasitesi, 7, 14 ve 21 günlük hücre kültürlemesinden sonra Alizarin Red boyama yoluyla kalsiyum birikintileri değerlendirilerek çıkarıldı (Şekil 4.9a). 14. gün ve 21. günde piklerle mineralizasyon açısından hafif bir artış fark edildi. 21. günde, tüm numuneler, doku kültürü dereceli polistiren flasklardaki kontrol grubuna kıyasla mineralizasyon açısından önemli ölçüde daha yüksek değerler ($p<0,01$) sergiledi. Ek olarak, en yüksek mineralizasyon değeri, saf ve ağırlıkça %0,05 Mn katkılı sinterlenmiş β-TCP bazlı peletlerde gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 9. Saf ve Mn katkılı β-TCP bazlı 1000°C sıcaklıkta sinterlenmiş seramik esaslı kompozit malzemeler üzerinde kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşması ve mineralizasyonu: (a) ALP aktivitesi ve (b) 405 nm'de okunan Alizarin Kırmızısı boyama absorbans değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar, sırasıyla < 0.05, 0.01, 0.001 ve 0.0001 p-değerlerini ifade eden '*', '**', '***' ve '****' ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak, mineralizasyon sonuçları ve ALP aktivitesi, osteoblast hücrelerinin canlılığı, proliferasyonu, farklılaşması ve mineralizasyonu için en sürdürülebilir ve faydalı mikro ortamın S0.05 tipi numune tarafından sağlandığını gösterdi. Kalsiyum fosfat biyoseramiklerinde optimum bir Mn ikame seviyesinin tanımlanması, artan ALP aktivitesinin ve mineralizasyonun sağlanmasında büyük önem taşıyabilir, çünkü bu, Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre de kemik morfogenetik protein 2 (BMP-2) ekspresyonunu daha da arttırabilir [100]. Kıkırdak dokularının oluşumunda büyük bir rol oynadığı bilinen BMP-2, osteoblastların çeşitli hücre tiplerine farklılaşmasını indükleyebilir.

5
SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada saf β-TCP ve eser miktarda Mn karıştırılarak seramik esaslı kompozit malzeme üretilmiştir. Üretilen kompozitlerin mekanik, mikroyapı ve biyouyum özellikleri araştırılmıştır. Saf β-TCP ve ağırlıkça %0.01, %0.05, %0.1, %0.5 ve %1 Mn içeren farklı karışımlar, 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C sıcaklıklarda 4 saat süre ile sinterlenerek kompozit yapıdaki biyomalzemeler elde edilmiştir.

1- Yapılan XRD analizi sonucunda, 1000 ve 1100 °C sıcaklıklarda sinterlenen tüm seramik esaslı kompozit numunelerin, ağırlıkça yaklaşık olarak %94 – 96 oranında β-TCP ve %4 – 6 oranında HA içerdiği ve Mn katkısının bu sıcaklık aralığında faz değişimine neden olmadığı belirlenmiştir. 1200 ve 1300 °C sıcaklıklarda sinterlenen numunelerde, hem β-TCP hem de HA yerine ağırlıkça yaklaşık olarak %8 – 17oranında α-TCP fazı oluşumu gözlemlenmiştir. 1200 °C'de sinterlenen numunelerde Mn katkısının , β-TCP'nin bozunma hızını azalttığı, 1300 °C'de sinterlenen numunelerde ise β-TCP → α-TCP dönüşümüne karşı etkisiz kaldığı ve dönüşümün gerçekleştiği belirlenmiştir.
2- Ağırlıkça %0.01, %0.05, %0.1, %0.5 ve %1 Mn içeren farklı karışımlardan, 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C sıcaklıklarda 4 saat süre ile sinterlenerek oluşturulan β-TCP kompozitlerinin yoğunluklarının sinterleme sıcaklığı ile arttığı gözlemlenmiştir. Ancak 1100 °C sıcaklıkta sinterlenmiş numunelerde ağırlıkça %0,05 üzerideki mangan ilavesi daha fazla yoğunluk artışı göstermemiştir.
3- 1000 °C ve 1300 °C sıcaklıklarda sinterlenmiş saf β-TCP ve ağırlıkça %0.01, %0.05, %0.1, %0.5 ve %1 Mn içeren β-TCP esaslı numuneler üzerinde yapılan SEM deneylerinde, 1000 °C sıcaklıkta sinterlenen numunelerde daha küçük tane boyutu, 1300 °C sıcaklıkta sinterlenen numunelerde ise daha büyük tane boyutu gözlemlenmiştir. 1000 °C sıcaklıkta sinterlenmiş tüm seramik numunelerinde gözenekli yapılara rastlanmasına rağmen, ağırlıkça %0.05 ve %0.1 Mn içeren β-TCP esaslı sinterlenmiş seramik numunelerin diğerlerine göre daha az poroziteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ağırlıkça %0.05 ve %0.1

Mn içeren numunelerde 10 – 25 μm aralığında daha büyük boyutlu taneler elde edilmiş, ağırlıkça %0.5 ve %1 Mn içeren numunelerde ise 2.5 – 8 μmaralığında daha küçük tane boyutları belirlenmiştir.

4- Ağırlıkça %0.01, %0.05, %0.1, %0.5 ve %1 Mn içeren farklı karışımlardan, 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C sıcaklıklarda 4 saat süre ile sinterlenerek oluşturulan β-TCP kompozitlerinin basma mukavemeti, sertlik ve elastik modülü değerlerinin, saf halde bulunan ve 1000, 1100, 1200 ve 1300 °C sıcaklıklarda 4 saat süre ile sinterlenerek oluşturulan β-TCP numunelere göre daha düşük değerlerde olduğu ve Mekanik özellik değerlerinin Mn katkısı arttıkça azaldığı belirlenmiştir.
5- 1000 °C sıcaklıkta 4 saat süre ile sinterlenmiş numuneler üzerinde yapılan hücre canlılığı deneylerinde, ağırlıkça %0,05 Mn katkılı β-TCP esaslı peletin, Mn içeren β-TCP numuneler arasında en yüksek hücre canlılığı sergilediği gözlemlenmiştir. Mn, hücre adhezyonunu etkileyen doza bağımlı bir mikro besindir. Bu sebeple, Mn katkısı seviyesinden bağımsız olarak, 21. güne kadar osteoblastlara karşı hiçbir sitotoksik etki gözlemlenmemiştir. 21. günde, tüm Mn katkılı β-TCP esaslı peletlerde, hem kontrol hem de saf β-TCP numunelerine göre daha yüksek hücre canlılığı saptanmıştır.
6- 1000 °C sıcaklıkta 4 saat süre ile sinterlenmiş ağırlıkça %0.01, %0.05, %0.1, %0.5 ve %1 Mn içeren β-TCP seramikleri, kontrol numunesine göre 14 gün sonra önemli osteoblast farklılaşması sergilemiştir. 21 günlük hücre kültürlemesinden sonra, farklılaşma normalleşmiş, biyolojik kontrole benzer değerlere sahip olduğu tespit edilmiş, bu da Mn ile indüklenen osteoblastik farklılaşmanın arttığını göstermiştir.

Sonuç olarak;

Saf β-TCP ye Mn katkısı ile üretilen seramik esaslı kompozitlerde eser miktarda Mn katkısının biyouyumluluk özelliklerine olumlu yönde etki ettiği gözlemlenmiştir.

Yapılan hücre çalışmalarında, Saf β-TCP ve ağırlıkça %0.05 Mn içeren, 1000 °C sıcaklıkta 4 saat süre ile sinterlenmiş seramik esaslı kompozit numunelerinde hücre canlılığının en yüksek olduğu, porozitenin düştüğü ve tane boyutlarının küçüldüğü belirlenmiştir.

Mangan katkısının yapılan çalışma sonucunda biyouyumlu iskelet malzemesi olarak kullanımında hücre canlılığını pozitif yönde etkileyeceği sonucuna varılmıştır.

Literatür taramasında seramik esaslı kompozitlerde mekanik özellikler ile ilgili fazla sayıda çalışma olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılacak yeni çalışmalarda katkı elementi olarak kullanılan mangana ek olarak veya doğrudan farklı bir element kullanılarak oluşturulacak seramik esaslı kompozit yapıdaki malzemelerin mekanik özelliklerinin detaylı incelenmesi önerilmektedir.

Bunun yanında Mn katkısı ile çalışmada gözlemlenmiş olumlu hücre canlılığı özelliklerinin desteklenmesi için yeni deneylerin yapılması önerilmektedir. Yapılacak yeni deneylerin, biyomalzemelerin özelliklerinin geliştirilmesine ve yapay doku olarak seramik esaslı kompozit üretiminde Mn kullanımının arttırılmasına olumlu katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

[1] Agarwal, R., & García, A. J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Advanced drug delivery reviews*, 2015;*94*, 53-62.

[2] Qu, H., Fu, H., Han, Z., & Sun, Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC advances*, 2019;*9*(45), 26252-26262.

[3] Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H., & Glogauer, M. (2015). Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials*, *8*(9), 5744-5794.

[4] Bohner, M., Santoni, B. L. G., & Döbelin, N. β-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta biomaterialia*, 2020;*113*, 23-41.

[5] Zhao, C. Q., Xu, X. C., Lu, Y. J., Wu, S. Q., Xu, Z. Y., Huang, T. T., & Lin, J. X. Doping lithium element to enhance compressive strength of β-TCP scaffolds manufactured by 3D printing for bone tissue engineering. *Journal of Alloys and Compounds*, 2020;*814*, 152327.

[6] Sinusaite, L., Popov, A., Antuzevics, A., Mazeika, K., Baltrunas, D., Yang, J. C., & Zarkov, A. Fe and Zn co-substituted betα-tricalcium phosphate (β-TCP): Synthesis, structural, magnetic, mechanical and biological properties. *Materials Science and Engineering: C*, 2020;*112*, 110918.

[7] de Moura, T. C., Afadlal, S., & Hazell, A. S. Potential for stem cell treatment in manganism. *Neurochemistry International*, 2018;*112*, 134-145.

[8] Racette, B. A. Manganism in the 21st century: the Hanninen lecture. *Neurotoxicology*, 2014;*45*, 201-207.

[9] Torres, P.M.C., Vieira, S. I., Cerqueira, A. R., Pina, S., da Cruz Silva, O. A. B., Abrantes, J. C. C., & Ferreira, J. M. F. Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of β-tricalcium phosphate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014;*136*, 57-66.

[10] Bae, Y. J., & Kim, M. H. Manganese supplementation improves mineral density of the spine and femur and serum osteocalcin in rats. *Biological trace element research*, 2008;*124*(1), 28-34.

[11] Brodziak-Dopierała, B., Kwapuliński, J., Sobczyk, K., & Wiechuła, D. The content of manganese and iron in hip joint tissue. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2013;*27*(3), 208-212.

[12] Fadeeva, I. V., Fomin, A. S., Barinov, S. M., Davydova, G. A., Selezneva, I. I., Preobrazhenskii, I. I., ... & Volchenkova, V. A. Synthesis and properties of manganese-containing calcium phosphate materials. *Inorganic Materials*, 2020;*56*(7), 700-706.

[13] Li, J., Deng, C., Liang, W., Kang, F., Bai, Y., Ma, B., ... & Dong, S. Mn-containing bioceramics inhibit osteoclastogenesis and promote osteoporotic bone regeneration via scavenging ROS. *Bioactive materials*, 2021;*6*(11), 3839-3850.

[14] Wu, T., Shi, H., Liang, Y., Lu, T., Lin, Z., & Ye, J. Improving osteogenesis of calcium phosphate bone cement by incorporating with manganese doped β-tricalcium phosphate. *Materials Science and Engineering: C*, 2020;*109*, 110481.

[15] Rau, J. V., Fadeeva, I. V., Fomin, A. S., Barbaro, K., Galvano, E., Ryzhov, A. P., ... & Uskokovic, V. Sic Parvis Magna: Manganese-substituted tricalcium phosphate and its biophysical properties. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019;*5*(12), 6632-6644.

[16] Baş, N. S., & Baş, S. The Effectiveness of CT Metal Artifact Reduction Technique and Its Contribution to Radiological Evaluation in Lumbar Stabilization. *Bagcilar Medical Bulletin*, 2021;*6*(3), 264-271.

[17] Willems, NM., Langenbach, GE., Everts, V., Zentner, A., The microstructural and biomechanical development of the condylar bone: a review*, European Journal of Orthodontics*, 2014;36(4):479-85

[18] Kalkandelen, C. Hidroksiapatit Esaslı Biyoseramik Malzemelerin Karakterizasyonu. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2016

[19] Akay, T., *Genel Histoloji,* Altıncı Baskı, Palme Yayınları, ISBN 975-7477-92-3 P:141-162, 2006

[20] Bouvier, M., *The biology and composition of bone*. Bone Mechanics. In: Cowin C.S. editor Florida: CRC press;.p.2–13, 1989

[21] Guyton, A.C., Hall, J.E., Tıbbi fizyoloji cep kitabı, (Çev. Z. Solakoğlu), Nobel Tıp Kitabevleri, 728p, 2003

[22] Junqueira L.C and Carneiro J*., Basic Histology,* 10th ed. Chapter 8, McGraw-Hill, New York, 2003

[23] Caetano-Lopes, J., Canhao, H., & Fonseca, J. E. Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatológica portuguesa*, 2007;*32*(2), 103-110.

[23] Rho, J. Y., Kuhn-Spearing, L., & Zioupos, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical engineering & physics*, 1998;*20*(2), 92-102.

[24] Kümbüloğlu, Ö., & Oral, O. Biyomateryaller. *Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2013;*34*(1), 27-33.

[25] Brånemark, P. I., Breine, U., Adell, R., Hansson, B. O., Lindström, J., & Ohlsson, Å. Intrα-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies.

Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery, 1969;*3*(2), 81-100.

[26] Huri, P. Y., Hasırcı, N., & Hasırcı, V. Kemik doku mühendisliği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2010;*19*(4), 206-219.

[27] Dai, R., Wang, Z., Samanipour, R., Koo, K. I., & Kim, K. Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem cells international*, 2016; 1-19.

[28] Mravic, M., Péault, B., & James, A. W. Current trends in bone tissue engineering. *BioMed research international*, 2014; 1-5

[29] Arahira, T., & Todo, M. Variation of mechanical behavior of β-TCP/collagen two phase composite scaffold with mesenchymal stem cell in vitro. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2016;*61*, 464-474.

[30] Ratner, B. D., & Zhang, G. A history of biomaterials. In *Biomaterials science* (pp. 21-34). Academic Press, 2020.

[31] Zaokari, Y., Persaud, A., & Ibrahim, A. Biomaterials for adhesion in orthopedic applications: a review. *Engineered Regeneration*, 2020;*1*, 51-63.

[32] Kim, B. S., Park, I. K., Hoshiba, T., Jiang, H. L., Choi, Y. J., Akaike, T., & Cho, C. S. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 2011;*36*(2), 238-268.

[33] Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., & Chiellini, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in polymer Science*, 2010;*35*(4), 403-440.

[34] Sarkar, D., Zhao, W., Schaefer, S., Ankrum, J. A., Teo, G. S., Pereira, M. N., & Karp, J. M. Chapter II. 6.2-overview of tissue engineering concepts and applications. *Biomaterials Science*, 2013;1122-1137.

[35] Malafaya, P. B., Silva, G. A., & Reis, R. L. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*, 2017;*59*(4-5), 207-233.

[36] Rodrigues, C. V. M., Serricella, P., Linhares, A. B. R., Guerdes, R. M., Borojevic, R., Rossi, M. A., & Farina, M. Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2003;*24*(27), 4987-4997.

[37] Elzoghby, A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research. *Journal of Controlled Release*, 2013;*172*(3), 1075-1091.

[38] Santoro, M., Tatara, A. M., & Mikos, A. G. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. *Journal of controlled release*, 2014;*190*, 210-218.

[39] Sowmya, S., Bumgardener, J. D., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., & Jayakumar, R. Role of nanostructured biopolymers and bioceramics in enamel, dentin and periodontal tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, 2013;*38*(10-11), 1748-1772.

[40] Lee, K. Y., & Mooney, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 2012;*37*(1), 106-126.

[41] Yang, J. S., Xie, Y. J., & He, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate polymers*, 2011;*84*(1), 33-39.

[42] Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P. S., Deepthi, S., Chennazhi, K. P., Ehrlich, H., ... & Jayakumar, R. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. Progress in Polymer Science, 2014;39(9), 1644-1667.

[43] Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y., & Cheng, T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical research*, 2006;*133*(2), 185-192.

[44] Wang, Y., Kim, H. J., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, 2006;*27*(36), 6064-6082.

[45] Hardy, J. G., & Scheibel, T. R. Composite materials based on silk proteins. *Progress in Polymer Science*, 2010;*35*(9), 1093-1115.

[46] Brown, A. C., & Barker, T. H. Fibrin-based biomaterials: modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta biomaterialia*, 2014;*10*(4), 1502-1514.

[47] Zhou, H., & Xu, H. H. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2011;*32*(30), 7503-7513.

[48] Lam, J., Truong, N. F., & Segura, T. Design of cell–matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. *Acta biomaterialia*, 2014;*10*(4), 1571-1580.

[49] Özkurt, B., & Tabak, A. Y. Metalik biyomateryaller ve metallozis. *Totbid Dergisi*, 2011;*10*(2), 83-86.

[50] Alvarez, K., & Nakajima, H. Metallic scaffolds for bone regeneration. *Materials*, 2009;*2*(3), 790-832.

[51] Navarro, M., Michiardi, A., Castano, O., & Planell, J. A. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the royal society interface*, 2008;*5*(27), 1137-1158.

[52] Pasinli, A. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler. *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2004;*4*(4), 25-34.

[53] Bobyn, J. D., Toh, K. K., Hacking, S. A., Tanzer, M., & Krygier, J. J. Tissue response to porous tantalum acetabular cups: a canine model. *The Journal of arthroplasty*, 1999;*14*(3), 347-354.

[54] Hacking, S. A., Bobyn, J. D., Toh, K. K., Tanzer, M., & Krygier, J. J. Fibrous tissue ingrowth and attachment to porous tantalum. Journal of biomedical materials research, 2000;52(4), 631-638.

[55] Adams, J. E., Zobitz, M. E., Reach Jr, J. S., An, K. N., Lewallen, D. G., & Steinmann, S. P. Canine carpal joint fusion: a model for four-corner arthrodesis using a porous tantalum implant. *The Journal of hand surgery*, 2005;*30*(6), 1128-1135.

[56] Meneghini, R. M., Lewallen, D. G., & Hanssen, A. D. Use of porous tantalum metaphyseal cones for severe tibial bone loss during revision total knee replacement. *JBJS*, 2008;*90*(1), 78-84.

[57] Takahashi, Y., Yamamoto, M., & Tabata, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 2005;*26*(17), 3587-3596.

[58] Tomın, E., Beksaç, B., & Lane, J. M. Amerika Birleşik Devletlerinde ortopedik girişimlerde otogreftlerin yerine kullanılan materyallere toplu bakış. *Artroplasti Artoplastik Cer. Derg*, 2002;*13*, 114-129.

[59] Cao, H., & Kuboyama, N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/β-TCP for bone tissue engineering. *Bone*, 2010;*46*(2), 386-395.

[60] Seo, J. P., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., & Sasaki, N. Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatin/β-tricalcium phosphate sponges. *Research in veterinary science*, 2012;*93*(3), 1481-1486.

[61] Ebrahimi, M., Botelho, M. G., & Dorozhkin, S. V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering: C*, 2017;*71*, 1293-1312.

[62] Tebyanian, H., Norahan, M. H., Eyni, H., Movahedin, M., Mortazavi, S. J., Karami, A., & Baheiraei, N. Effects of collagen/β-tricalcium phosphate bone graft to regenerate bone in critically sized rabbit calvarial defects. *Journal of applied biomaterials & functional materials*, 2019;*17*(1), 2280800018820490.

[63] Li, X., Liu, H., Niu, X., Fan, Y., Feng, Q., Cui, F. Z., & Watari, F. Osteogenic differentiation of human adipose- derived stem cells induced by osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2011;*97*(1), 10-19.

[64] Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 2012;*30*(10), 546-554.

[65] Schepers, E. J., Ducheyne, P., Barbier, L., & Schepers, S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant dentistry*, 1993;*2*(3), 151-156.

[66] Turunen, T., Peltola, J., Helenius, H., Yli- Urpo, A., & Happonen, R. P. Bioactive glass and calcium carbonate granules as filler material around titanium and bioactive glass implants in the medullar space of the rabbit tibia. *Clinical oral implants research*, 1997;*8*(2), 96-102.

[67] Wang, X., Nyman, J. S., Dong, X., Leng, H., & Reyes, M. Fundamental biomechanics in bone tissue engineering. *Synthesis Lectures on Tissue Engineering*, 2010;*2*(1), 1-225.

[68] Armentano, I., Bitinis, N., Fortunati, E., Mattioli, S., Rescignano, N., Verdejo, R., ... & Kenny, J. M. Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 2013;*38*(10-11), 1720-1747.

[69] Rasal, R. M., Janorkar, A. V., & Hirt, D. E. Poly (lactic acid) modifications. *Progress in polymer science*, 2010;*35*(3), 338-356.

[70] Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in polymer science*, 2010;*35*(10), 1217-1256.

[71] Dash, T. K., & Konkimalla, V. B. Poly-ϵ-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*, 2012;*158*(1), 15-33.

[72] Anderson, J. M., Hiltner, A., Wiggins, M. J., Schubert, M. A., Collier, T. O., Kao, W. J., & Mathur, A. B. Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. *Polymer International*, 1998;*46*(3), 163-171.

[73] Gunatillake, P. A., Adhikari, R., & Gadegaard, N. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 2003;*5*(1), 1-16.

[74] Nair, L. S., & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 2007;*32*(8-9), 762-798.

[75] Sokolsky-Papkov, M., Agashi, K., Olaye, A., Shakesheff, K., & Domb, A. J. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 2007;*59*(4-5), 187-206.

[76] Zhou, C. C., Ye, X. J., Fan, Y. J., Qing, F. Z., Chen, H. J., & Zhang, X. D. Synthesis and characterization of CaP/Col composite scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Composites Part B: Engineering*, 2014;*62*, 242-248

[77] Wilson, C. E., Kruyt, M. C., de Bruijn, J. D., van Blitterswijk, C. A., Oner, F. C., Verbout, A. J., & Dhert, W. J. A new in vivo screening model for posterior spinal bone formation: comparison of ten calcium phosphate ceramic material treatments. *Biomaterials*, 2006;*27*(3), 302-314.

[78] Johari, N., Fathi, M.N., Golazar, M.A. Fabrication, characterization and evaluation of the mechanical properties of poly (e-caprolactone)/nano-fluoridated hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. Composites: Part B 43 (2012) 1671–1675

[79] Ramay, H. R., & Zhang, M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2004;*25*(21), 5171-5180

[80] Kumar, V., Dev, A., & Gupta, A. P. Studies of poly (lactic acid) based calcium carbonate nanocomposites. *Composites Part B: Engineering*, 2014;*56*, 184-188

[81] Liu, C. C., Solderer, A., Heumann, C., Attin, T., & Schmidlin, P. R. Tricalcium phosphate (-containing) biomaterials in the treatment of periodontal infrα-bony defects: A systematic review and metα-analysis. *Journal of Dentistry*, 2021;*114*, 103812.

[82] Punj, S., Singh, J., & Singh, K. Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future prospectives. *Ceramics International*, 2021;*47*(20), 28059-28074.

[83] Hou, Z. L., Liu, Y., Mao, X. H., Wei, C. Y., Meng, M. Y., Liu, Y. H., ... & Xiao, Z. C. Transplantation of umbilical cord and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a patient with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cell adhesion & migration*, 2013;*7*(5), 404-407.

[84] Uskoković, V., Ignjatović, N., Škapin, S., & Uskoković, D. P. Germanium-doped hydroxyapatite: Synthesis and characterization of a new substituted apatite. *Ceramics International*, 2022;*48*(19), 27693-27702

[85] Taherimehr, M., Bagheri, R., & Taherimehr, M. In-vitro evaluation of thermoplastic starch/betα-tricalcium phosphate nano-biocomposite in bone tissue engineering. *Ceramics International*, 2021;*47*(11), 15458-15463

[86] LeGeros, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. Chemical reviews, 2008;108(11), 4742-4753.

[87] Araújo, M. G., Liljenberg, B., & Lindhe, J. β- tricalcium phosphate in the early phase of socket healing: an experimental study in the dog. *Clinical oral implants research*, 2010;*21*(4), 445-454

[88] Stahl, S. S., & Froum, S. Histological evaluation of human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants: I. Three to eight months. *Journal of Periodontology*, 1986;*57*(4), 211-217.

[89] Müller, P., Bulnheim, U., Diener, A., Lüthen, F., Teller, M., Klinkenberg, E. D., and Rychly, J. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2008;*12*(1), 281-291

[90] Carrodeguas, R. G., & De Aza, S. α-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta biomaterialia*, 2011;*7*(10), 3536-3546.

[91] Sinusaite, L., Renner, A. M., Schuetz, M. B., Antuzevics, A., Rogulis, U., Grigoraviciute-Puroniene, I., & Zarkov, A. Effect of Mn doping on the low-temperature synthesis of tricalcium phosphate (TCP) polymorphs. *Journal of the European Ceramic Society*, 2019;*39*(10), 3257-3263.

[92] Carbajal, L., Serena, S., Sainz, M. A., & Caballero, A. Phase and melting relationships of β, α and α′-Ca3 (PO4) 2 polymorphs in the Ca3 (PO4) 2-Zn3 (PO4) 2 system. *Journal of the European Ceramic Society*, 2017;*37*(5), 2277-2283.

[93] Döbelin, N., Brunner, T. J., Stark, W. J., Fisch, M., Conforto, E., & Bohner, M. Thermal treatment of flame- synthesized amorphous tricalcium phosphate nanoparticles. *Journal of the American Ceramic Society*, 2010;*93*(10), 3455-3463.

[94] Roozbahani, M., Alehosseini, M., Kharaziha, M., & Emadi, R. Nano-calcium phosphate bone cement based on Si-stabilized α-tricalcium phosphate with improved mechanical properties. *Materials Science and Engineering: C*, 2017; *81*, 532-541.

[95] Taktak, R., Elghazel, A., Bouaziz, J., Charfi, S., & Keskes, H. Tricalcium phosphate-Fluorapatite as bone tissue engineering: Evaluation of bioactivity and biocompatibility. *Materials Science and Engineering: C*, 2018;*86*, 121-128.

[96] Jamil, M., Elouahli, A., Abida, F., Khallok, H., Gourri, E., Kheribech, A., & Hatim, Z. Development of triphasic hydroxyapatite/(α and β)-tricalcium phosphate based composites by sintering powder of calcium-apatite in the presence of montmorillonite. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 2020;*30*(7), 2489-2498

[97] WHO.*Manganeze and Its Compounds: Environmental Aspects.* Geneva, 2004: 6-7.

[98] Hasan, H. (2008). *Manganese*. The Rosen Publishing Group, Inc.

[99] Boz Eravcı, D. Ağır Metal Maruziyetinin Sağlık Etkilerinin Değerlendirilmesi: Seramik Sektörü Örneği. Yüksek Lisans Tezi, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2016.

[100] Liu, T., Lv, G., Mesbah, M., Nasiri-Tabrizi, B., & Wu, S. Investigation on structural properties and bioactivity of nanosized biphasic calcium phosphate. *Ceramics International*, 2021;*47*(19), 26720-26731

[101] Ryu, H. S., Youn, H. J., Hong, K. S., Chang, B. S., Lee, C. K., & Chung, S. S. An improvement in sintering property of β-tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate. *Biomaterials*, 2002;*23*(3), 909-914.

[102] Bohner, M., Santoni, B. L. G., & Döbelin, N. β-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta biomaterialia*, 2020;*113*, 23-41.

[103] Turhan, E. A., Pazarçeviren, A. E., Evis, Z., & Tezcaner, A. Properties and applications of boron nitride nanotubes. *Nanotechnology*, 2022.

[104] Jillavenkatesa, A., & Condrate Sr, R. A. The infrared and Raman spectra of β-and α-tricalcium phosphate (Ca3 (PO4) 2). *Spectroscopy letters*, 1998;*31*(8), 1619-1634.

[105] Topsakal, A., Ekren, N., Kilic, O., Oktar, F. N., Mahirogullari, M., Ozkan, O., and Gunduz, O. Synthesis and characterization of antibacterial drug loaded β-tricalcium phosphate powders for bone engineering applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2020;*31*(2), 1-17.

[106] Jeong, J., Kim, J. H., Shim, J. H., Hwang, N. S., & Heo, C. Y. . Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *In Biomaterials Research* (Vol. 23, Issue 1), 2019.

[107] Tian, Y., Lu, T., He, F., Xu, Y., Shi, H., Shi, X., & Ye, J. β-tricalcium phosphate composite ceramics with high compressive strength, enhanced osteogenesis and inhibited osteoclastic activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018;*167*, 318-327.

[108] Lüthen, F., Bulnheim, U., Müller, P. D., Rychly, J., Jesswein, H., & Nebe, J. B. Influence of manganese ions on cellular behavior of human osteoblasts in vitro. *Biomolecular engineering*, 2007;*24*(5), 531-536.

[109] Westhauser, F., Wilkesmann, S., Nawaz, Q., Hohenbild, F., Rehder, F., Saur, M., & Boccaccini, A. R. Effect of manganese, zinc, and copper on the biological and osteogenic properties of mesoporous bioactive glass nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2021;*109*(8), 1457-1467.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirisi

1. M. C. Arpak, S. Daglilar, C. Kalkandelen, G. E. Stan, L. M. Balescu, I. Pasuk, K. Durukan, H. Turkoglu Sasmazel and O. Gunduz, "Kemik yenileme uygulamaları için mangan katkılı β-trikalsiyum fosfat bazlı seramiklerin değerlendirilmesi" *8.Uluslararası Erciyes Bilimsel Araştırmalar Kongresi,* Kayseri, 2022, pp. 380 – 389.