

**BİYOMİMETİK YÖNTEMLE BOR KATKILI DOKU
İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KEMİK DOKU
MÜHENDİSLİĞİNDEKİ ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DEVELOPMENT OF BORON CONTAINING TISSUE
SCAFFOLDS BY BIOMIMETIC METHOD AND
INVESTIGATION OF THEIR EFFECTIVENESS IN BONE
TISSUE ENGINEERING**

ÖZGE EKİN TUNÇAY

Prof.Dr.MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

ÖZGE EKİN TUNÇAY'ın hazırladığı “**Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Prof. Dr. Mehlika PULAT)

Danışman

(Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU)

Üye

(Prof. Dr. Selma MUTLU)

Üye

(Doç. Dr. Aylin GÜRPINAR)

Üye

(Yrd. Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

06/09/2013

Özge Ekin TUNÇAY

ÖZET

BİYOMİMETİK YÖNTEMLE BOR KATKILI DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDEKİ ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Özge Ekin TUNÇAY

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Eylül 2013, 114 sayfa

Bu çalışma 112M705 numaralı “Mikrodalga desteği ile Biyomimetik Hidroksiapatit (HAp)-Bor Katkılı HAp Oluşumu ve Kitosan-HAp Kemik Doku İskelelerinin Geliştirilmesi” adlı TÜBİTAK Projesi desteği ile hazırlanmıştır. Sunulan tez çalışmasının amacı, mikrodalga uygulaması ile desteklenmiş biyomimetik yöntemi kullanarak, osteoindüktif özelliğe sahip bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) üretilmesi ve kemik doku rejenerasyonunu destekleyen, bor katkılı hidroksiapatit ile kaplanmış kitosan (B-HAp/kitosan) doku iskelelerinde hücrelerin kemik doku oluşturma potansiyellerinin incelenmesidir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, farklı miktarlarda borik asit içeren 10xSBF (yapay vücut sıvısı)’den bor katkılı hidroksiapatit elde etmek amacıyla, sodyum hidroksit ilavesi ile çökelmenin gerçekleşeceği pH değeri ayarlanmıştır. B-HAp, borik asit içeren SBF’deki iyonların mikrodalga enerjisiyle etkileşimleri sonucu üretilmiştir. Borun hidroksiapatitin yapısına katılması, fosfat ya da hidroksil gibi iyonların borat iyonlarıyla yer değiştirmesiyle gerçekleşir. Farklı mikrodalga güçleri ve uygulama süreleri ile denemeler yapılarak B-HAp’nin üretildiği en uygun koşullar belirlenmiştir. Sonuç olarak, %1.15±0.11 (w/w) bor içeren, 1.40 (w/w) Ca/P oranına ve %4.30±0.07 (w/w) karbonat içeriğine sahip, 30±4 nm boyutlarında çubuk benzeri morfolojide ve kemik benzeri amorf yapıda B-HAp 10 mg/mL borik asit içeren 10xSBF’den 600 W mikrodalga gücü kullanılarak üretilmiştir.

Çalışmanın sonraki aşamasında, 100 µm gözenek çapına sahip kitosan doku iskeleleri dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan bu iskeleler, mekanik ve biyoaktif özelliklerinin iyileştirilmesi için mikrodalga ışımasının etkisiyle B-SBF kullanılarak B-HAp ile kaplanmıştır. Yüzeydeki ve gözeneklerin içerisindeki apatit yapısının varlığı, taramalı elektron mikroskopu (SEM), Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) ve X ışını kırınımı (XRD) analizleri ile gösterilmiştir. İskelelerin fiziksel özelliklerindeki değişimin incelenmesi amacıyla, kontrol grubu olarak bor içermeyen hidroksiapatit kaplı kitosan iskeleler aynı koşullarda üretilmiştir. Sonuç olarak, her bir B-HAp/kitosan iskelede bulunan bor miktarı yaklaşık 20 µg olarak hesaplanmıştır. İskelelerin şişme oranının 28.9 ± 1.4 , gözenekliliğinin $\%85.7 \pm 2.5$ olduğu belirlenmiştir. Mikrodalga ışımının etkisiyle kitosan doku iskelesinin gözeneklerine nüfuz eden etkin bir kaplamanın yapılabildiği ve bu kaplamanın doku iskelelerinin kararlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında, borun L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, her bir iskeleye yüklenen bor miktarı dikkate alınarak 9-300 µg/mL konsantrasyon aralığında incelenmiştir. B-HAp/kitosan iskelelerin biyoaktivitesi ise MC3T3-E1, preosteoblastik hücre hattı ile *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Hücre canlılığı ve üremesi MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi, hücrelerin morfolojik özellikleri ise taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin osteojenik farklılaşma belirteçleri olan, kolljen Tip I, RunX2, osteokalsin ve osteopontin gen ifadeleri RT-PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar B-HAp/kitosan iskelelerin hücre yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını kitosan ve HAp/kitosan iskelelerden daha fazla desteklediğini göstermiştir.

Sonuç olarak, bor katkısının MC3T3-E1 hücrelerinin çoğalma ve kemik hücrelerine farklılaşma özelliklerini arttırdığı ve bor katkılı kitosan doku iskelesinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için alternatif bir yapı olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Bor, yapay vücut sıvısı, mikrodalga, hidroksiapatit, kitosan, kemik doku mühendisliği.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BORON CONTAINING TISSUE SCAFFOLDS BY BIOMIMETIC METHOD AND INVESTIGATION OF THEIR EFFECTIVENESS IN BONE TISSUE ENGINEERING

Özge Ekin TUNÇAY

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

September 2013, 114pages

This thesis was prepared with the support of TÜBİTAK Project, entitled “Mikrodalga desteği ile Biyomimetik Hidroksiapatit (HAp)-Bor Katkılı HAp Oluşumu ve Kitosan-HAp Kemik Doku İskelelerinin Geliştirilmesi” with the code number 112M705. The aim of the present study is to produce boron doped hydroxyapatite (B-HAp), which has an osteoinductive property, using biomimetic method supported by different microwave energies and to investigate *in-vitro* osteogenesis potential of B-HAp coated chitosan (B-HAp/chitosan) scaffolds.

In the first part of the study, different amounts of boric acid was added into 10xSBF (simulated body fluid) and pH was adjusted by using sodium hydroxide to obtain proper pH value for precipitation. B-HAp was produced by means of the interaction of the ions within the boron containing 10xSBF (B-SBF) and microwave energy. Boron incorporation into HAp structure consists of substitution of borate ions with such as phosphate and hydroxyl ions. Experiments were carried out in different microwave powers and exposure times, and optimum conditions for the production of B-HAp were determined by evaluating the results of characterization studies. B-SBF precipitated from 10 mg/mL boric acid (H_3BO_3) solution by 600 W microwave power has 1.15 ± 0.11 % (w/w) boron, 1.40 (w/w) Ca/P ratio, 4.30 ± 0.07 % (w/w) carbonate content, 30 ± 4 nm rod-like morphology and bone-like amorphous structure.

Chitosan scaffolds, which have approximately 100 μm pore diameter, were prepared by freeze-drying technique. Then, these scaffolds were coated with B-

HAp in the presence of B-SBF and microwave radiation in order to improve their bioactivities and mechanical properties. The formation of apatite layer and the penetration of apatites into the pores were observed morphologically by scanning electron microscopy (SEM). Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and X-ray diffraction (XRD) analysis also confirmed the presence of boron doped hydroxyapatite layer. Only hydroxyapatite coated chitosan scaffolds (HAp/chitosan) were also produced by using same conditions to compare the physical properties of the scaffolds. For each B-HAp/chitosan scaffolds; amount of doped boron, swelling ratio and porosity was found to be 20 µg, 28.91±1.41 and 85.7±2.57 %, respectively. It was observed that, B-HAp coating with microwave radiation increased the stability of chitosan scaffolds.

In the last part of the study, boron cytotoxicity on L929 fibroblastic cell line was performed between 9-300 µg/mL boron concentrations. Then, the bioactivity of B-HAp/chitosan scaffolds was investigated by cell culture studies which were carried out with a mouse preosteoblastic cell line, MC3T3-E1, under static conditions. Cell viability and proliferation were analyzed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and morphological examination was done with scanning electron microscopy (SEM). Osteogenic differentiation markers, collagen-I, RunX2, osteocalcin and osteopontin expression levels of the cells were determined using RT-PCR (real time polymerase chain reaction). Results demonstrated that cells attached, proliferated and differentiated on B-HAp/chitosan scaffolds much more than other scaffolds.

In conclusion, it was determined that boron enhances proliferation and osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells and B-HAp/chitosan scaffold could be considered as a potential scaffold for bone tissue engineering applications.

Keywords: Boron, simulated body fluid, microwave, hydroxyapatite, chitosan, bone tissue engineering.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve tecrübeleriyle, tez çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesi için gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen, yaklaşımlarında hep anne sıcaklığını hissettiğim, her şeyden önce hayata karşı duruşuyla ve bir bilim insanı olarak hayatım boyunca örnek alacağım çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na, bu süreçte hep yanımda olduğu ve sağladığı olanaklar için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama 112M705 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK'a** teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca, beni hem bilimsel anlamda destekleyen hem de motivasyon konuşmalarını hiç eksik etmeyen canım arkadaşım **T.Tolga Demirtaş'a**,

Her şeyden önce bana sonsuz dostluklarını armağan eden, artık olmaz dediğim anlarımı olura çeviren ve tezimin her noktasında desteklerinin izleribulunan, sevgili can dostlarım **Anıl Sera Çakmak** ve **Arş. Gör. Soner Çakmak'a**,

Bana sevilmenin, yardımlaşmanın ve dostluğun en derin hazzını yaşatan, umutsuz anlarımın umut ışıkları, en içten kahkahalarımın sebepleri; bitmez tükenmez enerjisiyle bana ilham veren ve tez sürecimdeki fedakarlıkları unutulmaz kurtarıcım **Arş. Gör. Merve Çapkın Yurtsever'e**, yol arkadaşım destekçim süper kahramanım **Müşra Zeren'e**, sadece bakışarak bile anlaşabildiğim kıymetlim **Arş. Gör. Damla Çetin Altındal'a** ve kusursuz sohbetine doyamadığım iyilik meleğim **Arş. Gör. Işıl Gerçek Beşkardeş'e**,

Berber çalışmaktan büyük keyif duyduğum ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşlarım **Gökçe Kaynak, Murat Şimşek, Gülseren Irmak, Nazife Ülker ve Suna Sop'a**,

Bana Ankara'yı sevdiren ve yalnızlığımı asla hissettirmeyen, dostluklarının bir ömür benimle olmasını dilediğim inci tanelerim **Alev'im, Aslı'm, Merve'm** ve **Seda'ma**,

Hayatıma değer katan, her ihtiyacım olduğunda yanıbaşımdaya olan, akademik disiplinini ve çalışkanlığını yaşamım boyunca örnek alacağım biricik **Behice Ablam'a**,

Tüm mutlu ve umutsuz anlarımda benimle olan ve evlerinin kapılarını her zaman sonuna kadar açan, yanlarında huzur bulduğum çok değerli **Müjgan Teyzem, Ekber Amcam** ve umut kaynağım canım **Erdem'ciğime**,

Hayatım boyunca kendimi bana sanki hala karnındaymışım gibi güvende hissettiren, desteği, sabrı, sevgisiyle beni sarıp sarmalayan, azmi, pratikliği ve dik duruşuyla örnek aldığım kıymetlim, canım **Annem'e**;neşesiyle, sevgisiyle hayatımızı dolduran, zekasına ve hayata dair görüşlerine hayranlık duyduğum, beni her daim sorgusuz destekleyen, emekçi **Babam'a**; ve elleri üstümden hiç gitmesin istediğim, minik annem, her şeyim, yoldaşım, desteğim, sol yanım, biricik **Ablam'a**,

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Kemik Doku	4
2.1.1.Kemik dokunun yapısı	4
2.1.2.Kemik oluşumu ve morfolojisi	6
2.1.3.Kemik rejenerasyonu.....	7
2.2.Kemik Doku Mühendisliği	7
2.2.1.Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler	9
2.2.2.Kemik doku iskeleleri ve temel özellikleri.....	9
2.2.2.1.Kemik doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler	10
2.2.2.2.Kemik doku iskelesi üretim yöntemleri.....	13
2.2.3.Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyosinyaller	16
2.3.Bor.....	17
2.3.1.Borun tarihçesi	17
2.3.2.Borun Türkiye için önemi	17
2.3.3.Borun kimyasal özellikleri ve kullanım alanları	18
2.3.4.Bor ve sağlık.....	20
2.3.5.Borun vücuttaki etkileri	20
2.3.5.1. Borun kemik doku üzerine etkileri	23
2.4.Hidroksiapatit.....	24
2.4.1.Hidroksiapatit üretim yöntemleri	26
2.4.2.İyon katkılı hidroksiapatitler	31
2.4.3.Bor katkılı hidroksiapatit	33
2.5.Mikrodalga Enerjisi	36
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	39
3.1.Kullanılan Malzemeler	39
3.2.Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Hidroksiapatit Üretimi ve Karakterizasyonu.....	40
3.2.1.Bor katkılı hidroksiapatit üretimi.....	40

3.2.2.Bor katkılı hidroksiapatitin karakterizasyonu.....	43
3.2.2.1.Endüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) analizi.....	43
3.2.2.2.Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDX) analizi.....	43
3.2.2.3.Elementel analiz.....	44
3.2.2.4.Raman spektroskopisi.....	44
3.2.2.5.X ışını kırınımı (XRD) analizi.....	44
3.2.2.6.Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi.....	44
3.2.2.7.Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi.....	44
3.2.2.8.Üretim verimi.....	44
3.3.Kompozit Doku İskelerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu.....	45
3.3.1.Kitosan, B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan doku iskelelerinin üretimi.....	45
3.3.2.B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan kompozit doku iskelelerinin karakterizasyonu.....	46
3.3.2.1.Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi.....	47
3.3.2.2.X ışını kırınımı (XRD) analizi.....	47
3.3.2.3.Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDX) analizi.....	47
3.3.2.4.Şişme deneyleri.....	47
3.3.2.5.Gözenekliliğin belirlenmesi.....	47
3.4.Hücre Kültürü Çalışmaları.....	48
3.4.1.L929 fibroblast hücre hattı ile yapılan sitotoksikite çalışmaları.....	48
3.4.2.Hücrelerin doku iskelelerine ekilmesi.....	48
3.4.3.MTT analizi.....	49
3.4.4.Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi.....	50
3.4.5.İmmunohistokimyasal boyama.....	50
3.4.6.RT-PCR analizleri.....	51
3.5.İstatistiksel Analiz.....	53
4.DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	54
4.1.Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Hidroksiapatit Üretimi ve Karakterizasyonu.....	54
4.1.1.Bor katkılı hidroksiapatit üretimi.....	54
4.1.2.Bor katkılı hidroksiapatitin karakterizasyonu.....	56
4.1.2.1.Endüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) analizi.....	56
4.1.2.2.Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDX) analizi.....	59
4.1.2.3.Elementel analiz.....	60

4.1.2.4.Raman spektroskopisi	60
4.1.2.5.X ışını kırınımı (XRD) analizi	62
4.1.2.6.Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi	63
4.1.2.7.Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi	65
4.1.2.8.Üretim verimi	67
4.2.Kompozit Doku İskelelerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu	67
4.2.1.Kitosan, B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan doku iskelelerinin üretimi	70
4.2.2.B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan doku iskelelerinin karakterizasyonu	72
4.2.2.1.ATR-FTIR analizi	72
4.2.2.2.XRD analizi.....	73
4.2.2.3.SEM analizi	74
4.2.2.4.Şişme çalışmaları	78
4.2.2.5.Gözenekliliğin belirlenmesi	79
4.3.Hücre Kültür Çalışmaları	80
4.3.1.L929 fibroblast hücre hattı ile yapılan sitotoksosite çalışmaları	80
4.3.2.MTT analizi.....	83
4.3.3.Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	85
4.3.4.İmmunohistokimyasal boyama	90
4.3.5.RT-PCR analizleri.....	91
5. GENEL SONUÇLAR	98
KAYNAKLAR.....	101
ÖZGEÇMİŞ	114

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Kemiğin hiyerarşik yapısı [20].....	5
Şekil 2.2. Kemiğin mikroskobik yapısı.	6
Şekil 2.3. Kemik doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi.	8
Şekil 2.4. Doku iskelesi tasarımında biyobozunurluğun önemi.....	11
Şekil 2.5. Hidroksiapatitin kristal yapısı.	32
Şekil 2.6. Mikrodalga magnetron tüpünün (a) üstten (b) yandan görünüşü [128].	36
Şekil 2.7. Geleneksel ısıtma ve mikrodalga ile ısıtma.	38
Şekil 3.1. HAp ve B-HAp üretiminin şematik gösterimi.	42
Şekil 3.2. Doku iskelelerinin mikrodalga fırında B-HAp ve HAp ile kaplama işlemlerinin şematik gösterimi.....	46
Şekil 4.1. Sistemin Gibbs serbest enerjisini düşürmek için izlenen kristalizasyon yolları [141].....	55
Şekil 4.2. Mikrodalga desteği ile üretilen HAp (a) 500x, (b) 1,000x, (c) 4,000x, (d) 30,000x ve B-HAp (e) 500x, (f) 1,000x, (g) 5,000x, (h) 30,000x örneklerinin SEM görüntüleri.....	59
Şekil 4.3. HAp örneğine ait Raman spektrumu.....	61
Şekil 4.4. B-HAp örneğine ait Raman spektrumu.	62
Şekil 4.5. Çalışma kapsamında mikrodalga ile sentezlenen HAp (a), B-HAp (b) ve Kırınım Verileri için Uluslar Arası Merkez'den (ICDD) alınan saf HAp (c) örneklerine ait XRD spektrumları.....	63
Şekil 4.6. HAp (a) ve B-HAp (b) örneklerine ait ATR-FTIR spektrumları.	65

Şekil 4.7. Mikrodalga desteği ile üretilen HAp (a, b ve c) ve B-HAp (d, e ve f) örneklerine ait TEM görüntüleri. Barlar sırasıyla a ve d) 100nm, b ve e) 50 nm, c ve f) 20 nm uzunlukları işaret etmektedir.....	66
Şekil 4.8. Kitin (a) ve kitosanın (b) kimyasal yapısı.	68
Şekil 4.9. Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonlarının kitosan zincirlerine bağlanmasının şematik gösterimi [156].....	69
Şekil 4.10. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan kitosan (a), HAp/kitosan (b) ve B-HAp/kitosan (c) doku iskelelerinin görüntüleri.	71
Şekil 4.11. Çalışma kapsamında hazırlanan kitosan (a), HAp/kitosan (b) ve B-HAp/kitosan (c) doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları.	73
Şekil 4.12. Kitosan doku iskelesi (a) ve mikrodalga yardımı ile (600 W) HAp (b), B-HAp (c) kaplanmış kitosan doku iskelelerine ve Kırınım Verileri için Uluslar Arası Merkez'den (ICDD) alınan saf HAp' ye (d) ait XRD grafikleri.....	74
Şekil 4.13. Dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen kitosan doku iskelesinin farklı büyütmelerine (a) x130, (b) x 500 ait SEM görüntüleri.....	75
Şekil 4.14. Mikrodalga yardımıyla SBF içinde 1 kez kaplanan HAp/kitosan doku iskelesine ait SEM görüntüleri (a) 250 X, (b) 10,000 X.....	75
Şekil 4.15. Mikrodalga yardımıyla 10xSBF'de 4 kez kaplama yapılmış doku iskelelerine ait SEM görüntüleri: HAp/kitosan (a)100x, (b)500x, (c)1,000x (d)5,000x, (e)10,000x, (f)50,000x, B-HAp/kitosan (g)100x, (h)500x (ı)1,000x, (j)5,000x, (k)10,000x, (l)20,000x.....	76
Şekil 4.16. Kompozit doku iskelelerinin yan kesitlerine ait SEM görüntüleri: HAp/kitosan (a) 100x, (b) 200x, (c) 500x ve B-HAp/kitosan (d) 100x, (e) 200x, (f) 500x.	77
Şekil 4.17. Kitosan ve kompozit doku iskelelerinin kuru halde (üst sıra) ve şişme sonrası (alt sıra) görüntüleri: kitosan (a), HAp/kitosan (b), B-HAp/kitosan (c).	79

Şekil 4.18. Kültür ortamlarına farklı konsantrasyonlarda bor eklenen L929 hücrelerine ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu 0 µg iken* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	81
Şekil 4.19. Farklı bor konsantrasyonları eklenen kültür ortamlarında üreyen L929 hücrelerine ait kristal viyole boyama görüntüleri (Olympus IX71, 20x).	82
Şekil 4.20. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	83
Şekil 4.21. Kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: 4. gün (a) 100X, (b) 500x, (c) 1,000x, 7.gün (d) 100x, (e) 500x, (f) 1,000x, (g) 5,000x, 14.gün (h) 100x, (i) 500x, (i) 1,000x, (j) 5,000x.....	86
Şekil 4.22. HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: 4. gün (a) 100x, (b) 500x, (c) 1,000x, (d) 5,000x, (e) 10,000x, 7.gün (f) 100x, (g) 500x, (h) 1,000x, (i) 5,000x, (i) 10,000x, 14.gün (j) 100x, (k) 500x, (l) 1,000x, (m) 5,000x, (n) 10,000x.	87
Şekil 4.23. B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: 4. gün (a) 100x, (b) 500x, (c) 1,000x, (d) 5,000x, (e) 10,000x, 7.gün (f) 100x, (g) 500x, (h) 1,000x, (i) 5,000x, (i) 10,870x, 14.gün (j) 100x, (k) 500x, (l) 1,000x, (m) 5,000x, (n) 10,000x.	89
Şekil 4.24. Kitosan (a), HAp/kitosan (b), B-HAp/kitosan (c) iskelelerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 7 günlük inkübasyon sonrası anti-Faktin antikoru (yeşil) ve DAPI (mavi) ile immünofloresan boyamaları.	90
Şekil 4.25. Kitosan (a), HAp/kitosan (b), B-HAp/kitosan (c) iskelelerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 21 günlük inkübasyon sonrası anti-Faktin antikoru (yeşil) ve DAPI(mavi) ile immünofloresan boyamaları.	91
Şekil 4.26. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl kollajen-I gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken, *** p<0.001; kontrol grubu HAp/kitosan iken ● p<0.05, ●●● p<0.001).	93

Şekil 4.27. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl RunX2 gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). 94

Şekil 4.28. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl osteokalsin gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). 95

Şekil 4.29. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl osteopontin gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, kontrol grubu HAp/kitosan iken ● p<0.05, ●●● p<0.001). 96

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Doku iskelesi üretim yöntemleri.....	14
Çizelge 2.2. İnsanlarda organ veya sıvıların normal bor konsantrasyonu [74].	21
Çizelge 2.3. İnsan vücudunda kemik dokunun inorganik bileşimi [92]......	25
Çizelge 2.4. İnsan plazmasının ve sentetik çözeltilerin iyon derişimleri, mM.....	30
Çizelge 2.5. Kalsiyum fosfat tuzları [92].	31
Çizelge 3.1. 10xSBF çözelti reçetesi (Toplam hacim 1 L).	41
Çizelge 3.2. Taş ve Bhaduri-SBF reçetesi (Toplam hacim 2L)......	41
Çizelge 3.3. Mikrodalga destekli B-HAp ve HAp üretim koşulları.	43
Çizelge 3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.	52
Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında üretilen B-HAp ve HAp örneklerinde bulunan %Ca, %P, %B, Ca/P,Ca/P+B ve P/B oranları.	57
Çizelge 4.2. HAp ve B-HAp örneklerinin ağırlıkça %CO ₃ ²⁻ oranları.	60
Çizelge 4.3. HAp ve B-HAp için görülmesi beklenen ve görülen pikler.....	64
Çizelge 4.4. Farklı yöntemler ile hazırlanan HAp ve B-HAp örneklerinin ürün verimleri.....	67
Çizelge 4.5. Kitosana ait karakteristik FTIR bantları.....	73
Çizelge 4.6. Tez kapsamında üretilen doku iskelelerinin şişme karakteristikleri...	78
Çizelge 4.7. Doku iskelelerinin yüzde gözeneklilik değerleri.	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikro
β	Beta
ϵ	Epsilon
ρ	Çözelti Yoğunluğu (g/mL)
t_d	İkilenme süresi

Kısaltmalar

ACP	Amorf Kalsiyum Fosfat
ALP	Alkalen Fosfataz
ATR-FTIR	Fourier Dönüşümlü Toplam Yansıması Azaltılmış Kızılötesi Spektroskopisi
BNCT	Bor Nötron Yakalama Terapisi
BOREN	Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü
cDNA	Komplementer DNA
DCDP	Dikalsiyum Fosfat Dihidrat
DCP	Dikalsiyum Fosfat Anhidroz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTA-TG	Diferansiyal Termal Analiz- Termogravimetrik Analiz
ECM	Hücre Dışı Matris
FBS	Fötal Sığır Serumumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GAG	Glikozaminoglikan
HAp	Hidroksiapatit
HMDS	Heksametildisilazan

ICP	Optik Emisyon Spektroskopisi
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
KOL-I	Kollajen Tip I
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
MAS-NMR	KatıHal Nükleer Manyetik Rezonans
MC3T3-E1	Fare Osteoblast Hücre Hattı
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCD	Nanokristalin Elmas
OCN	Osteokalsin
OPN	Osteopontin
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PBS/A	%1 Sığır Serum Albümin İçeren PBS
PDGF	Platalet Kökenli Büyüme Faktörü
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SBF	Yapay Vücut Sıvısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCP	Trikalsiyum Fosfat
TCPS	Hücre Kültür Kabı
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu
TGF- β	Transforme Büyüme Faktörü Beta
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör- α
XRD	X Işını Kırınımı
α -MEM	Minimum Essential Medium Alpha Modification
β -TCP	Beta-trikalsiyum Fosfat

1. GİRİŞ

Doku hastalıkları ve kusurları, özellikle de kemik hastalıkları, kemik dokunun yapısal işlevinin yanında homeostazda da görev alması nedeniyle, yaşamın kalitesini ve standardını ciddi bir şekilde etkilemektedir[1]. Geleneksel tedavi yöntemleri olarak ön plana çıkan otolog ve allojenik kemik transplantasyonu, içerdiği dezavantajlar nedeniyle etkin bir tedavi sağlayamamaktadır [2]. Bu noktada yeni bir tedavi yaklaşımı olan **doku mühendisliği** gündeme gelmektedir. Günümüzde üzerinde en çok çalışılan biyotıp alanlarından birini oluşturan doku mühendisliği, biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerin tek başlarına veya birlikte kullanılarak biyolojik sistemlerdeki dokuların en iyi şekilde taklit edilebilmesini amaçlamaktadır [3].

Makroskobik ve mikroskobik ölçekte hiyerarşik yapıya sahip olan kemik dokunun hasarları için kullanılacak malzemelerin geliştirilebilmesi, öncelikle kemik oluşum sürecinin iyi anlaşılmasını gerektirmektedir. Bu amaçla, kemik hücreleri için 3-boyutlu bir iskele görevi gören hücre dışı matrisin (ECM) taklit edilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır [4]. Hücrelerin ve diğer organik bileşenlerin yanı sıra, nano boyuttaki inorganik yapılar olan hidroksiapatitlerin (HAp) kollajen fiberler üzerine yerleşmesi ile oluşan kemik doku, doğal bir kompozit yapıdır[5]. Bu yapının başarılı bir biçimde taklit edilebilmesi için, kemik doku mühendisliği uygulamalar için tasarlanan biyomalzemelerde polimerler ve biyoaktif seramikler bir arada kullanılmaktadırlar. Biyobozunur özellikteki polimerler üç boyutlu yapının elde edilmesini sağlarken, biyoaktif özelliğe sahip seramikler osteoindüktif özellikleriyle kemik rejenerasyonunu hızlandırırlar [6].

Hidroksiapatitler implant kaplamalarında yumuşak doku ile implant arasında bir arayüzey oluşturarak bağlanmayı arttırmak için ve lokal hasarların kapatılması için dolgu malzemesi olarak sıklıkla kullanılan biyoseramiklerdir[7]. Sentetik HAp'lerin üretimi için, sol-jel yaklaşımı, sulu çözeltilerden çöktürme yöntemi, hidrotermal yöntem, mikrodalga-hidrotermal yöntem, çoklu emülsiyon yöntemi, elektrokristalizasyon yöntemi ve biyomimetik çöktürme yöntemi gibi birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler içinde kemiğe en yakın hidroksiapatit yapısının elde edildiği yöntem **biyomimetik yöntem**'dir. Biyolojik HAp yapısında Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , F^- , Cl^- , CO_3^{2-} gibi pek çok sayıda iyonlar bulundurmaktadır ve Ca/P oranı sentetik HAp

yapısından sapma gösterir. Bu nedenle, HAp yapısına pek çok değişik elementler eklenerek kemik doku oluşumuna etkileri araştırılmaktadır [8].

Biyomimetik yöntem ile insan kan plazmasına eşit miktarda iyon konsantrasyonuna sahip yarı kararlı bir çözelti olan yapay vücut sıvısı (SBF) kullanılarak, polimerik malzemelerin yüzeylerinde HAp kaplama elde edilebilmektedir [9]. Ancak bu kaplama 2 haftaya kadar uzun sürede gerçekleşebilir. Bu nedenle farklı konsantrasyonlarda SBF (n-SBF; n=1.5x, 2x, 5x, 10x) çözeltileri hazırlanarak sorun aşılıma çalışılmıştır ve kaplama süresi kısaltılmıştır [10, 11].

İnsan vücudunda eser miktarlarda bulunan borun, osteogenezde ve kemiğin iyileşmesinde önemli görevler aldığı bilinmektedir. Kemikte ve diğer organlarda birikebilen borun, metabolik yolda aldığı görevler henüz tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, birçok çalışmada steroid hormonların sentezinde görev aldığı ve kemikte kalsiyum kaybını engellediği gösterilmiştir [12, 13] . Beslenme yoluyla günlük olarak alınan 3 mg boroptimum kalsiyum ve kemik metabolizmasını sağlama nedeniyle kullanımı gündeme gelmiştir [14]. Yapılan hücre kültür çalışmaları da borun kemik öncülü hücrelerinin farklılaşmasını desteklediğini göstermiştir [15]. Tüm bu bilgiler değerlendirildiğinde, **borun** kemik doku mühendisliğinde **osteoindüktif** bir ajan olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür. Ancak, borun kemik doku mühendisliği yaklaşımında doku iskeleleri ile birlikte kullanıldığı ve kemik oluşumunda etkinliğinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma mevcuttur.

Sunulan tez çalışmasının amacı, kemik doku rejenerasyonunu destekleyecek özelliklere sahip bor katkılı hidroksiapatitin (B-HAp), biyomimetik yöntemle sentezlenmesi ve kitosan doku iskelelerinin bu faz ile kaplanmasıyla, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak alternatif bir kompozit doku iskelesinin elde edilmesidir. Bu amaca yönelik olarak, belirlenen koşullardaki mikrodalga desteği ile uygun miktarda bor ilavesi yapılmış olan 10xSBF çözeltisi içerisindeki kitosan iskelelerin üzerinde bor katkılı kalsiyum fosfat fazı oluşması sağlanmıştır. Ayrıca, bor katkılı hidroksiapatit kaplamanın hücreler üzerine etkisinin daha iyi anlaşılması için, sadece hidroksiapatit kaplı doku iskelelerinin sentezi de gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen bor katkılı hidroksiapatit/kitosan (B-HAp/kitosan) kompozit doku iskelesinin osteojenik potansiyeli, kemik öncülü hücre hattı olan MC3T3-E1 hücreleriyle incelenmiş, bu iskelelerin kemik doku oluşturma etkinliği çeşitli analizler ile belirlenmiştir. Konu ile ilgili literatür bilgileri, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen sonuçlar devam eden bölümlerde sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

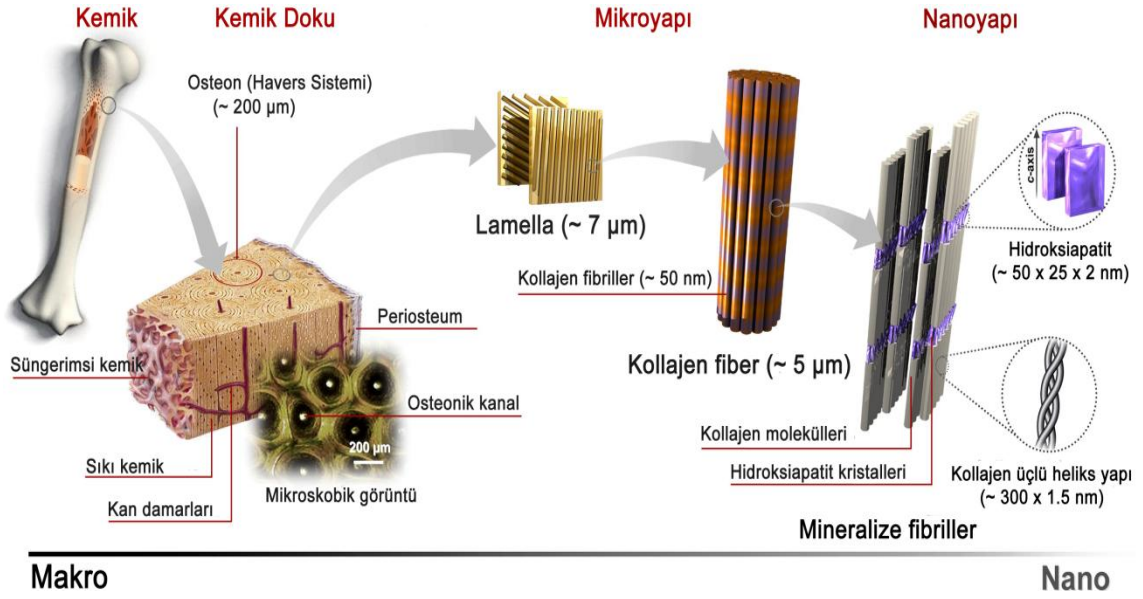
Bu bölümde sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgileri beş ana başlık altında özetlenmiştir. İlk bölümde kısaca kemik dokusunun yapısı ve özelliklerine yer verilmiştir. Ardından kemik doku hasarlarının tedavisi için doku mühendisliği yaklaşımları, kullanılan doku iskeleleri, hücreler ve biyosinyaller ile ilgili açıklamalar yapılmıştır. Üçüncü bölümde, tez çalışmasına özgünlük kazandıran bor mineralinin, tarihçesi, kimyası, kullanım alanları ve sağlık üzerine etkilerine yönelik literatür bilgilerine değinilmiştir. Dördüncü bölümde, kemik doku mühendisliğinde önemli bir yeri olan hidroksiapatitin çeşitleri ve üretim yöntemleri anlatılmıştır. Son bölümde ise mikrodalga enerjisi hakkında temel literatür bilgileri verilmiştir.

2.1. Kemik Doku

2.1.1. Kemik dokunun yapısı

Kemikler, kemik doku, kemik iliği ve bunları çevreleyen bir bağ doku olan **periosteum**dan oluşan oldukça damarlı ve sinirlerle donatılmış organlardır [16]. Periosteum osteojenik özelliktedir [17]. Vücudu koruyan, destekleyen ve hareketini sağlayan iskelet sisteminin bir bileşeni olan kemik, aynı zamanda kanın oluşumunu sağlayan **kemik iliği** gibi özelleşmiş dokular için de bir koruma ve üretim bölgesidir [18].

Vücudun diğer organlarında ve dokularında da olduğu gibi kemik doku da makrodan nanoya kadar değişen ölçülerde bileşenleri içeren hiyerarşik bir düzenlenmeye sahiptir (Şekil 2.1). Kemik dokusu, kemik hücre dışı matrisi (ECM) ve Tip I kollajen (KOL-I) gibi mineralize olmayan organik yapıların yanı sıra mineralize olan inorganik karbonatlı apatit yapılarını da içermektedir. ECM içeriğinde proteoglikanlar, glikoproteinler ve sialoproteinler gibi çok sayıda matris proteini bulunur [19]. Kemiğin inorganik bileşenleri ise hidroksiapatit kristalleri şeklinde bulunan kalsiyum ve fosfatların yanı sıra sitrat ve magnezyum gibi bileşenlerden oluşur. Kısacası kemik, genetik, metabolik ve mekanik faktörler tarafından etkilenen kalsiyum fosfat kristallerinin birikmesiyle güçlenmiş bir organik matristen oluşan mineralize bir dokudur. Diğer bir deyişle kemik, doğal bir kompozit malzemedir [18].



Şekil 2.1. Kemiğin hiyerarşik yapısı[20].

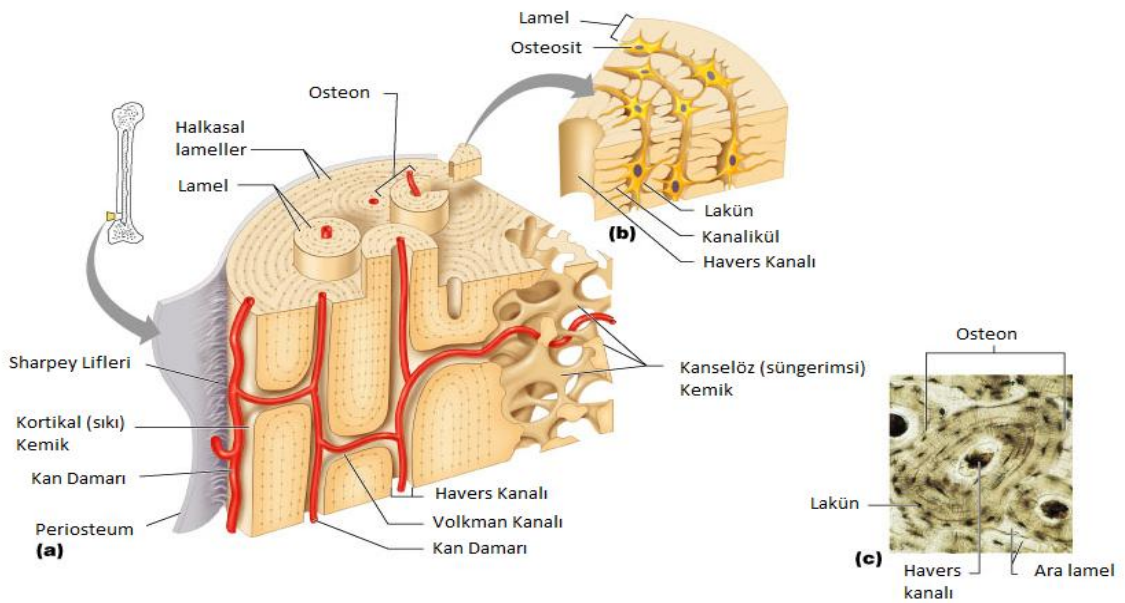
Kemik, sert ve mineralize bir doku olmasına rağmen kan damarları ve çeşitli hücre tiplerini içeren canlı bir dokudur [17, 21]. Kemiğin yapımında ve yeniden düzenlenmesinde görev alan farklı hücre tipleri bulunmaktadır. Bu hücreler osteoprojenitör (osteoblast öncülü) hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır. Farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler olan **osteoprojenitör hücreler** uygun çevrede osteoblastlara dönüşürler. Bu hücreler periosteum, endosteum ve Havers kanallarında, uyarılma durumunda kemik oluşumu için osteoblastlara farklılaşmak için hazır durumda bulunurlar.

Osteoblastlar, preosteoblastlar ya da osteoprojenitör hücrelerden köken alan tamamen farklılaşmış hücrelerdir [16, 22]. Kemik oluşma bölgelerinde yeni kemik matrisini sentezlerler [23]. Kübik ya da alçak prizmatik boylu hücrelerden yapılmış iri çekirdekli hücrelerdir. Salgıladıkları alkalin fosfat (ALP) enzimi ile kalsifikasyon gerçekleşir ve dokuda mineralizasyon başlar. Kemiğin esas hücresi olan **osteositler** lakünalar içinde yerleşmiş olup, sentez yapamadıklarından granüllü endoplazmik retikulumları ve Golgi cisimcikleri azdır. Bu hücreler uzantıları sayesinde lakünada gömülü kalmayarak diğer hücrelerle iletişim kurarlar. Osteositler aynı zamanda kalsiyum metabolizmasında da rol oynarlar. **Osteoklastlar** ise makrofaj hücre tipi olup, 20-100 µm çapında büyük ve çok sayıda çekirdeğe sahip hücrelerdir ve kemik rezorpsiyonundan sorumludurlar. Osteoklastlar, içerdikleri kollajenaz ve diğer proteolitik enzimlerle kemiği rezorbe ederler [17].

2.1.2. Kemik oluşumu ve morfolojisi

Kemikler iki farklı gelişim süreciyle oluşmaktadır. **Endokondral kemikleşme** ile apendiküler kemikler, yüz kemikleri, omurga ve lateral köprücük kemikleri olan uzun kemikler oluşurken, **intramembranöz kemikleşme** sonucunda kafatası kemikleri ve medial köprücük kemikleri oluşur [24].

Kemik morfolojik olarak, toplam iskeletin %20 'si olan **kortikal** (sıkı) ve %80 'i olan **kanselöz** (süngerimsi) kemik olmak üzere iki şekilde bulunur. Sadece %10 gözenekliliğe sahip kortikal kemik 3 farklı alt gruba ayrılır: 1) uzun 2) kısa ve 3) düz kemikler. Kanselöz kemik ise %50-90 gözenekliliğe sahiptir ve yaygın olarak uzun kemiklerin ortasında bulunur [25]. Kortikal kemik, kemik iliğini çevreleyen oldukça sert ve yoğun bir yapıda iken, kanselöz kemik boşluklu bir yapıya sahiptir. Kortikal osteonlar **Havers sistemi** olarak adlandırılır. Havers kanalı 20-100 µm çapındadır ve 1-2 adet damar içerir. Bu sistemler kortikal kemiğin içinde dallanmış olarak bulunan, yaklaşık olarak 400 mm boyunda ve 200 mm genişliğindeki silindirik yapılardır. Havers kanallarının etrafı 3-7 µm kalınlıktaki lamellerden, hücrelerden ve sert bir matristen oluşur. Her bir lamelde çok sayıda **kanalikül** adı verilen yapılar bulunur ve içerisinde osteositler yerleşmiştir. Havers kanalı diğer kanallarla, kemik iliğiyle ve periosteumla **Volkman Kanalları** sayesinde bağlantı kurar. Şekil 2.2'de kemiğin mikroskobik yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Kemiğin mikroskobik yapısı.

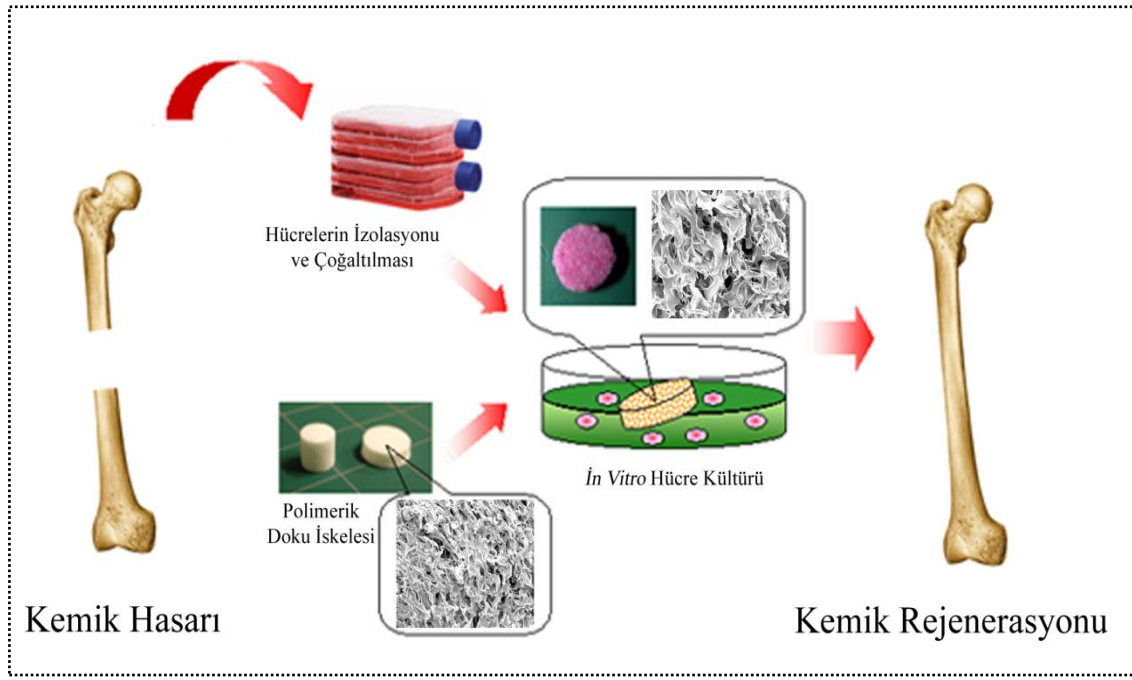
Kortikal kemik genel olarak kanselöz kemikten daha düşük metabolik aktiviteye sahiptir. Kortikal kemiğin dış yüzeyi **periosteum**, iç yüzeyi ise **endosteum** ile çevrilidir. Periosteum kemik onarımı, büyümesi ve beslenmesi için önemlidir. Kanselöz kemik ise 50 ile 400 mm kalınlığında değişen plaka ve çubuklardan oluşur. İki tip kemikte de bulunan lamelar yapılar ağırlıklı olarak KOL-I fibrillerin farklı düzenlenmesiyle meydana gelir [17, 23].

2.1.3. Kemik rejenerasyonu

Kemik kırıklarının iyileşmesi ve kemiğin yeniden şekillenmesi, birçok hücrenin görev aldığı kimyasal, mekanik ve elektriksel uyarıların karmaşık bir şekilde etkileşimiyle gerçekleşir. İyileşmede başlıca görev alan yerel faktörler kırık hematomu, kemik iliği, periost ve büyüme faktörleridir. Hasarlı bölgenin iyileşmesi hematoma oluşmasıyla başlar ve ortama ilk önce nötrofiller ve makrofajlar gelir. Bunların salgıladıkları kimyasallar ve bölgeye göç eden fibroblastlarla hücresel elemanlarda ve ara maddelerde artış, hücrelerde ise farklılaşma başlar. Multipotent etkiye sahip mezenkimal kök hücreler osteoblastlara farklılaşır. Bölgede oluşan ilk fibröz dokuya **kemik kallusu** denir. Ardından, bölgeye periosteum ve endosteumdan osteoblast göçü olur. Onarımda öncelikle olgunlaşmamış kemik dokusu olan primer kemik dokusu oluşur. Daha sonra bu doku ortadan kalkar ve yerini sağlam ve işlevsel esas kemik dokusu alır [17, 26].

2.2. Kemik Doku Mühendisliği

Tümörler, hastalıklar, enfeksiyonlar, travma, biyokimyasal bozukluklar ve normal olmayan iskelet gelişimi sonucu oluşan kemik hasarları önemli sağlık problemleridir. Ayrıca kemik kanserleri nedeniyle oluşan tümörlerin cerrahi işlemlerle çıkarılmasıyla, kemiğin yenilenebilmesi için iskelet devamlılığının ve mekanik desteğin sağlanması gereken kritik büyüklükte hasarlar meydana gelebilir [27]. Kemik kendi kendine iyileşme ve yara dokusu oluşmadan yenilenebilme kapasitesine sahip bir doku olmasına rağmen, bu gibi büyük hasarların onarımında yetersiz kalabilmektedir [28].



Şekil 2.3. Kemik doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi.

Kemik hasarlarının tedavisinde kullanılan malzemeler, kemik greftleri, seramikler ya da sentetik polimerlerdir. Kemik greftleri hastanın kendisinden (otogreft), başka bir vericiden (allogreft) ya da farklı bir türden (zenogreft) elde edilebilir [29]. Günümüzde kemik onarımı için "altın standard" hasarlı bölgeye otolog kemik naklidir [30]. Ancak bu işlem sırasında hastaya ikinci bir cerrahi işlem yapılmasına ihtiyaç duyulması ve hasarlı alanın büyüklüğü nedeniyle yeterli greftin alınamaması bu yöntemin önemli kısıtlamalarındandır. Patojenlerin taşınması ya da bağışıklık sistemi aktivasyonu gibi yan etkilerine karşın, allogreftler ve zenogreftler osteoindüktif özelliklerinden dolayı otogreftlere alternatif olarak tercih edilmektedir [29]. Tüm bu uygulamaların dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla tasarlanan **kemik doku mühendisliği yaklaşımlarında**, kemik hasarlarının onarılması ya da hasarlı dokunun yeniden yapılanması için doku iskeleleri (scaffold), hücreler ve büyüme faktörleri tek başlarına ya da bir arada kullanılmaktadır [16]. Şekil 2.3'te kemik doku mühendisliği yaklaşımı şematik olarak anlatılmaktadır. Bu yaklaşımda hücre dışı matrisi taklit ederek, kemik dokusunu üretmek amacıyla çok çeşitli doku iskeleleri geliştirilmiştir [30]. Hastanın kendisinden veya uygun bir kaynaktan alınan sağlıklı kemik hücreleri *in vitro* koşullarda çoğaltıldıktan sonra doku iskelelerine ekilmekte ve doku oluşumu gerçekleşmektedir. Eş zamanlı olarak da biyobozunur özellikteki doku iskelesi

bozunarak yerini gerçek dokuya bırakmaktadır. Elde edilen doku hasarlı bölgeye implante edilerek süreç tamamlanmaktadır.

2.2.1. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler

Doku mühendisliği yaklaşımlarında, en önemli basamaklardan biri uygun hücre kaynağının seçilmesidir [25]. Doku mühendisliği uygulamalarının başarısı, seçilen hücrelerin uygun fenotipte ve gerekli biyolojik fonksiyonları gösterebilen, yeterli üreme yeteneğine sahip hücreler olmasına bağlıdır [31].

İdeal bir hücre kaynağı kolaylıkla çoğalabilmeli, immunojenik olmamalı ve yenilenecek dokuya uygun proteinleri ifade edebilmelidir. Sıklıkla tercih edilen hücreler osteoblastlar ve mezenkimal kök hücrelerdir [25]. Osteoblastlar kemik dokuya özgü hücrelerdir ve hastadan cerrahi işlem ile alınan materyalden elde edilirler. Bu hücreler, immunojenik açıdan uyumları ile en göze çarpan hücreler olmalarına karşın, tamamen farklılaşmış ve post mitotik hücreler olmaları bazen kültür ortamında istenmeyen fenotip sergilemelerine neden olabilir [31]. Dokudan izole edilen osteoblastlar, ALP, osteokalsin ve KOL-1 gibi kemiğe özgü protein ve enzimleri sentezlerler ve böylece kemik doku yenilenmesine katkıda bulunurlar. *İn vitro* hücre kültür ortamlarında çeşitli ajanların da kullanılmasıyla, osteoblastların farklılaşması ve kalsifiye olması sağlanır. **Mezenkimal kök hücreler**vücuttaki farklı hücre tiplerine farklılaşma özelliğine ve yüksek yenilenme kapasitesine sahip hücrelerdir. Özellikle osteoblastlara farklılaşma kapasiteleri yüksek olan bu hücreler kemik iliği aspiratı, erişkin periferik kanı, kordon kanı, amniyotik sıvı, periosteum ve yağ dokusu gibi birçok dokudan elde edilebilir [22] ve elde edildiği dokular erişkin, embriyonik ya da fetal dokular olabilir [31].

Osteoblastlar, erişkin ve embriyonik kök hücrelerin yanı sıra, MC3T3-E1, SAOS-2, UMR-106 gibi osteoblast benzeri hücre dizileri de kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır. Ölümsüzleştirilen bu preosteoblast hücreler kolaylıkla kültüre edilebilir ve yüksek çoğalma kapasitesine sahiptirler [32-34].

2.2.2. Kemik doku iskeleleri ve temel özellikleri

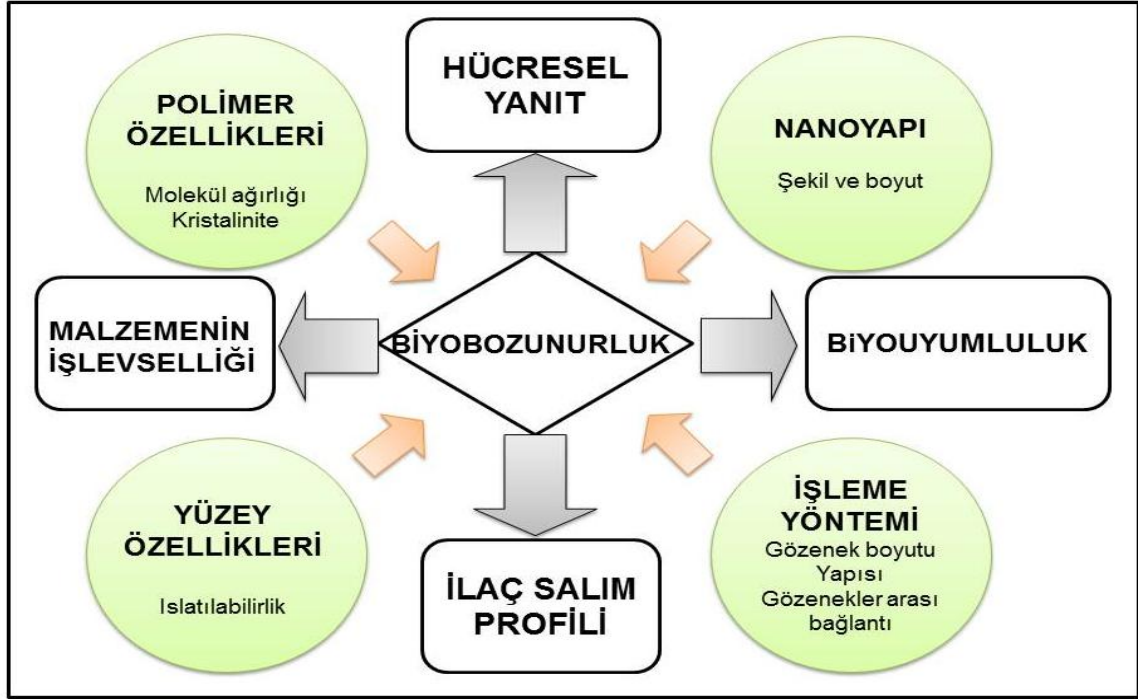
Doku iskeleleri, üç boyutlu bir mikroçevre olan ECM'yi taklit edecek şekilde tasarlanan yapılardır [3]. Bu yapılar içerisinde hücreler etkileşim halinde olabilmeli ve kendi hücre dışı matrislerini üretebilmelidir. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak ideal bir doku iskelesinin sahip olması gereken bazı

özellikler bulunmaktadır. Doku iskeleleri biyouyumlu olmalıdır. **Biyouyumluluk** hücre yapışmasını destekleme ve lokal ya da sistemik bir toksik etkiye neden olmama olarak tanımlanır. Hücre canlılığı için gerekli besinlerin ve oksijenin başarılı bir şekilde difüzyonunun sağlanması için, içsel bağlantılı gözeneklere sahip doku iskelesinin gözenek çapının en az 100 µm olması beklenmektedir [35, 36]. Kemik dokunun oluşabilmesi için ise ideal gözenek çapının 200-350 µm olduğu bilinmektedir [32]. Ancak yapılan çalışmalar gözeneklilik arttıkça mekanik dayanımın da azaldığını göstermektedir [37]. Kemik dokunun mekanik özellikleri kortikal kemikten kanselöz kemiğe farklılık göstermektedir. Kortikal kemiğin elastik modülü 15-20 GPa arasında değişirken, kanselöz kemiğinki 0.1-2 GPa arasındadır. Kortikal kemiğin basınç dayanımı 100-200 MPa iken, kanselöz kemikte bu değer 2-20 MPa'dır. Böylesine farklı mekanik özellik gösteren ve karmaşık bir geometriye sahip kemik doku için ideal bir iskele oluşturmak oldukça zordur. Gözeneklilik, doku damarlanmasının sağlanması için de oldukça önemlidir. Doku iskeleleri kolay ve istenilen boyutta üretilebilir olmalıdır [36]. Bu özelliklerin yanı sıra, **biyobozunurluk** anahtar bir özelliktir ve bozunma hızı önemlidir. Bozunmanın, istenilen doku oluşumu tamamlandıktan sonra gerçekleşmesi ve bozunma ürünlerinin toksik etki göstermemesi gereklidir. Bir doku iskelesinin biyobozunurluğu üretildiği malzemenin özelliklerine, boyutlarına, üretim yöntemine ve yüzey özelliklerine bağlıdır. Biyobozunurluk, doku iskelesinin neden olduğu hücresel yanıtı, biyouyumluluğu, işlevselliği ve eğer ilaç yüklenmişse salım profilini etkilemektedir. Şekil 2.4'te biyobozunurluğun doku iskelesi tasarımındaki önemi özetlenmiştir. Bu özelliklerin yanı sıra, doku iskeleleri hücre kültür çalışmalarında ve cerrahide kolaylıkla kullanılabilmesi için sterilizasyon, paketlenme ve taşıma gibi işlemlere de dayanıklı olmalıdırlar [35].

2.2.2.1. Kemik doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler

Kemik doku mühendisliği yaklaşımında, **osteoinduktif** (kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmalarını ve sonrasında kemik oluşturmalarını sağlayan malzemeler) ajanlar ve osteogenezin gerçekleşmesi için osteojenik hücrelerle birlikte, kemiğin içinde büyümesini destekleyecek **osteokondüktif** (hücrelerin üremelerini destekleyerek, kemiğin üç boyutlu yapısının oluşmasını sağlayan malzemeler) bir matris için kullanılacak biyomalzeme seçimi çok önemlidir [28]. Metal, seramik, polimer ve bunların kompozitlerinden oluşan biyomalzemeler,

organ ya da dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla tıp ve diş hekimliği alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [38]. Ortopedide en çok tercih edilen metal malzemeler, çelik ve kobalt ya da titanyum bazlı alaşımlardır. Bu malzemeler özellikle kalça protezi olarak birçok hastanın yaşam kalitesini arttırmasına karşın metalik yapıları nedeniyle doku mühendisliği açısından önemli iki dezavantaja sahiptirler: Biyobozunur değildirler ve işlenebilirlikleri oldukça sınırlıdır [39].



Şekil 2.4. Doku iskelesi tasarımında biyobozunurluğun önemi.

Vücudun zarar gören ya da işlevini yitiren parçalarının tamiri için geliştirilen özel tasarımı seramiklere **biyoseramikler** denilmektedir. Biyoseramikler **biyo inert** ve **biyoaktif** olmak üzere iki grupta incelenirler. Hidroksiapatit (HAp), trikalsiyum fosfat (TCP) ve oktakalsiyum fosfat biyoaktif yapıda biyoseramikler olup kemiğe yüksek oranda bağlanma kapasitesine sahiptirler [3]. Kemik mineralinin kimyasal ve kristal yapısına önemli ölçüde benzerlik gösteren bu kalsiyum fosfatlar, biyouyumlu, osteokondüktif ve osteoindüktifdirler. Hidroksiapatit bu gruptaki en iyi bilinen doku iskelesi malzemesidir. Ancak doku mühendisliği uygulamalarında tek başına kullanımı, biyobozunur olmayışı, mekanik özelliklerinin zayıflığı ve işleme zorluğu nedeniyle kısıtlıdır. Özellikle yük taşıyan bölgedeki kemiklerin onarımında çok sert olan bu malzemelerin kullanımı uygun değildir [40]. Bölüm 2.4'te HAp ve üretim yöntemleri ayrıntılı şekilde açıklanmıştır.

Polimerler doku iskelesi fabrikasyonunda öncü malzemelerdir. Çok farklı çeşit biyobozunur polimer doku mühendisliği alanında kullanılmakta olup temelde iki sınıfa ayrılabilirler: Doğal polimerler ve sentetik polimerler. Hiyaluronik asit, glikozaminoglikan, nişasta, aljinat ve kitin/kitosan gibi polisakkarit yapılı ya da soya, kollajen, fibrin ve ipek gibi protein yapılı doğal polimerler kemik onarımının yanı sıra sinir, kas ve deri dokusunun onarımında da kullanılmaktadır. Doğal polimerler enzimatik ya da hidrolitik biyobozunmaya duyarlı olmaları nedeniyle, fizyolojik mekanizmalarla metabolize olabilirler. Hayvanlardan, bitkilerden ya da mikroorganizmalardan elde edilen bu polimerler ile oluşturulan biyomalzemeler, gerçeğe yakın bir hücresel çevre oluşturmakla birlikte, polimerlerin biyolojik dokulardan elde edilmeleri nedeniyle her izolasyonda çeşitlilik gösterebilme eğilimleri yaygın kullamlarını kısıtlamaktadır. Ayrıca özel bir çözücü varlığında çözünebilen bu polimerler zayıf mekanik özelliklerinden dolayı da dezavantaja sahiptirler [39, 41, 42]. Sentetik polimerler ise kolay üretilebilir ve işlenebilir özelliktedirler. Bozunma süreleri, elastik özellikleri kontrol edilebilir ve vücuttaki enzimatik reaksiyonlardan etkilenmezler. Yaygın olarak kullanılan biyobozunur sentetik polimerler poli- α -hidroksi esterler olarak bilinen poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit) ve poli(ϵ -kaprolakton) polimerleridir. Hidrolizleri sonucu oluşan bozunma ürünleri doğal yollarla vücuttan uzaklaştırılır. Bunlara ilaveten, poli(karbonat) ve poli(fumarat)'lar da sıklıkla tercih edilen sentetik polimerlerdir [16, 40].

Doku iskelesi üretiminde kullanılacak biyomalzeme yeni kemiğin oluşumunun sağlanması için, osteoprojenitör hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını desteklemesinin yanı sıra osteokondüktif de olmalıdır. Bu amaçla biyobozunur polimerler ve biyoseramikler bir arada kompozit yapılar oluşturarak kullanılmaktadırlar. Kalsiyum fosfatların osteokondüktif ve polimerlerin biyobozunur özelliği bu iki malzemenin doğrudan karıştırılması ya da polimerlerin biyomimetik yöntemlerle kaplanmaları sonucu bir araya getirilebilir. Böylece doğal kemikte olduğu gibi organik ve inorganik yapıların bir arada bulunduğu bir matris elde edilir [43]. Kompozit malzemeler, homojen malzemelere oranla, yapısal uyumluluğun sağlanması açısından daha avantajlıdır [3].

2.2.2.2. Kemik doku iskelesi üretim yöntemleri

Doku mühendisliği çalışmalarında, doku iskelesi tasarımı ve üretimi en önemli basamaklardan biridir. Üretim için uygun yöntem, rejenerasyonu hedeflenen doku için gerekli özellikleri taşıyan bir doku iskelesinin elde edilebildiği yöntemdir. Fabrikasyon yöntemi malzemenin biyouyumluluğunu ve kimyasal özelliklerini değiştirmemelidir. Ayrıca, yeterli hassasiyete sahip ve tekrarlanabilir olmalıdır. Seramikler ve metaller, işlenmesi ve şekil verilmesi zor malzemeler olduğundan ancak yüksek sıcaklıklarda işlenerek, belirli geometrilere doku iskelesi üretimi yapılabilmektedir. Polimerler ise kolay işlenebilir malzemelerdir. Bu nedenle polimerik doku iskelelerinin fabrikasyonuna yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler **geleneksel yöntemler** ve **hızlı prototipleme yöntemleri** olarak 2 grupta incelenmektedir. Geleneksel yöntemlerle üretilen doku iskelelerinde gözenek boyutunun kontrolü ve gözeneklilik dağılımı, istenilen iskele geometrisinin oluşturulması açısından yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle üç-boyutlu doku iskelesi üretimi için bilgisayar destekli tasarım teknikleri (hızlı prototipleme) geliştirilmiştir. Çizelge 2.1'de sıklıkla tercih edilen doku iskelesi üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları özetlenmiştir [44, 45].

Çizelge 2.1. Doku iskelesi üretim yöntemleri.

Üretim Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Geleneksel yöntemler		
Dondurarak kurutma	Yüksek gözenekli yapı Yüksek bağlantılı gözenek	Küçük gözenek çapı
Elektroeğirme	Düşük maliyet Ayarlanabilir şekil, büyüklük ve mekanik özellik Çok çeşitli polimer kullanabilme Düzenlenmiş nanofiber üretimi	Organik çözücülerin kullanılması Üç boyutlu yapıların üretiminde elverişsiz
Fiber Bağlama	Kolay işleme Yüksek gözeneklilik Yüksek yüzey alanı/hacim oranı	Amorf olmayan polimerler için yüksek işleme sıcaklığı Düşük mekanik dayanım Çözücü uzaklaştırma problemi
Faz Ayırım	Biyoaktif ajanlarla etkileşime uygun Yüksek gözenekli yapı Ayarlanabilir şekil, büyüklük ve mekanik özellik	Mikro yapının kontrolünde yetersiz Düşük üretim verimi Farklı boyutlarda gözenek elde etmek için elverişsiz Çözücü uzaklaştırma problemi
Çözücü Döküm/Parçacık Uzaklaştırma	Farklı boyutlarda gözenek çapı Yüksek gözeneklilik Kristalinite ayarlanabilir	Düşük mekanik özellik Porojen ve çözücülerin yeterince uzaklaşmaması Membran kalınlığı sınırlı
Membran Laminasyonu	Makro yapının kontrolü Gözeneklilik ve gözenek boyutununun bağımsız kontrolü	Düşük mekanik özellik Çözücünün uzaklaştırılmaması Üretim süresinin uzunluğu Gözenekler arası zayıf bağlantı
Eriyik kalıplama	Makro yapının kontrolü Gözeneklilik ve gözenek boyutununun bağımsız kontrolü	Amorf olmayan polimerler için yüksek işleme sıcaklığı Porojenin uzaklaştırılmaması

Çizelge 2.1. Doku iskelesi üretim yöntemleri (Devamı).

Hızlı prototipleme yöntemleri

Üç boyutlu baskı tekniği (3DP)	Yüksek gözeneklilik Gözenek çapı: 45-100 µm Kolay işleme Yüksek yüzey alanı/hacim oranı Gözenekler arası yüksek bağlantı Farklı polimerleri işleyebilme	Toksik organik çözücülerin kullanımı Küçük gözenek çapı Zayıf mekanik dayanım
Eriterek birikim modellenmesi (FDM)	Yüksek gözeneklilik Gözenek çapı:250-1000 µm Yüksek yüzey alanı/hacim oranı Gözenekler arası yüksek bağlantı Çözücü kullanımı gerektirmez Gözeneklilik ve gözenek boyutununun bağımsız kontrolü	Yüksek işleme sıcaklığı Sınırlı sayıda polimer için uygun Farklı yönlerde gözenek oluşturma kısıtlı Farklı geometrilerde üretim zorluğu
Lazerle Kalıplama (SLS)	Yüksek gözeneklilik Gözenek çapı: 45-100 µm Yüksek yüzey alanı/hacim oranı Gözenekler arası yüksek bağlantı Çözücü kullanımı gerektirmez Farklı polimerler işleyebilme Gözeneklilik ve gözenek boyutununun bağımsız kontrolü	Yüksek işleme sıcaklığı Küçük gözenek çapı

2.2.3. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyosinyaller

Kırık iyileşmesi, vasküler sistem ve iskelet sistem öncü hücreleriyle birlikte kemik iliğindeki hematopoetik ve immün hücrelerin de yer aldığı karmaşık bir fizyolojik süreçtir. Bu süreçte büyüme ve farklılaşma faktörleri, hormonlar, sitokinler ve hücre dışı matris gibi birçok lokal ve sistemik düzenleyici faktör çok sayıda hücre tipiyle etkileşerek iyileşmeye destek olmaktadır. Bu faktörler 3 grup altında incelenebilir: (1) proinflamatuar sitokinler (2) Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) süper ailesi ve diğer büyüme faktörleri (3) metaloproteinazlar ve anjiyojenik faktörler.

Onarımın başlangıcında görev alan ve **proinflamatuar sitokinler** olarak bilinen interlökin-1(IL-1), interlökin-6 (IL-6), ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) yalnızca makrofajlar ve inflamatuvar hücreler tarafından değil, periosteumda bulunan mezenkimal hücrelerden de salgılanırlar. Kemotaktik etki ile diğer hücreleri uyararak hasarlı bölgede hücre dışı matris sentezinin artmasını, anjiyogenezin uyarılmasını sağlarlar. TGF- β süper ailesi kemik morfogenetik protein (BMP) ve TGF- β gibi büyüme ve farklılaşma faktörlerini içeren büyük bir ailedir. Kırık iyileşmesi intramembranöz ve endokondral kemikleşmenin farklı basamaklarında bu faktörlerden etkilenir. İyileşmenin erken safhalarında plateletlerden salgılanan platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) de mezenkimal hücreler ve osteoblastların göç etmesini ve çoğalmasını uyarırken, inflamatuvar hücreler üzerinde de kemotaktik bir etkiye neden olurlar. Bunlara ek olarak, kemik matris oluşumunu uyarıcı insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve fibroblast, miyosit ve osteoblast gibi hücrelerin farklılaşmasını sağlayan fibroblast büyüme faktörü (FGF) bu süreçte önemli rol oynayan moleküllerdir. Endokondral kemikleşmenin son basamağında ise spesifik matris metaloproteinazları kas ve kemik dokusunu yıkararak kan damarı oluşmasına olanak sağlarlar [46, 47].

Kırığın doğal iyileşme sürecinde etkin rol oynayan bu biyosinyal moleküller, kemik gelişiminin uyarılması ve desteklenmesi amacıyla birçok doku mühendisliği çalışmasında kullanılmıştır [48-51].

Ayrıca, *in vitro* hücre kültüründe osteojenik farklılaşmanın desteklenmesi amacıyla dekzametazon, askorbik asit ve β -gliserol fosfat kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, hücre kültür ortamında sentetik bir glukokortikoid olan dekzametazon

varlığında, osteogenezin uyarıldığını, hücrelerin çoğalma yeteneğinin ve ALP aktivitesinin arttığını göstermektedir. Buna bağlı olarak, dekzametazon mineralizasyonun da artmasına neden olmaktadır. Askorbik asit ise kollajen üretiminin artmasına destek olmakta ve ALP aktivitesini arttırmaktadır [52, 53]. Osteojenik besi ortamlarının kullanımı aynı zamanda osteopontin ve osteokalsin genlerinin ifadesinin artmasını da desteklemektedir [54].

Yukarıda adı geçen biyosinyal moleküllerinin yanısıra, çeşitli elementler ve bunların bileşikleri de kemik onarımı ve yeniden yapılanma sürecine katkıda bulunmaktadır. Bunlardan biri olan ve sunulan tez çalışmasının da temelini oluşturan "bor" ile ilgili olarak aşağıda ayrıntılı bilgi sunulmuştur.

2.3. Bor

Bor; hayvanlar, bitkiler ve insanlar için önemli bir iz elementtir [55]. Beslenme yoluyla vücuda alınan bor, birçok metabolik enzimin aktivitesini etkilemesinin yanı sıra, steroid hormonların ve kalsiyum, magnezyum, vitamin D gibi pek çok mikro besinin metabolizmasını da etkilemektedir [56].

2.3.1. Borun tarihçesi

Bor ve türevleri çok uzun yıllardan bu yana kullanılmaktadır. Bor tuzları ilk kez 4 bin yıl önce Tibet'te kullanılmıştır. Babiller tarafından değerli eşyaların ergitilmesinde, Mısırlılarca mumyalamada, Eski Yunan ve Romalılarca da zemine serpilerek arena temizliğinde kullanılmışlardır. 875 yılında ise, Araplar ilk kez bor tuzlarından ilaç yapmışlardır [57]. Bor bileşikleri çok uzun yıllardan bu yana bilinmesine rağmen, elementel borun keşfi 1808 yılında İngiliz kimyacı SirHumphry ve Fransız kimyacı GayLussac tarafından gerçekleştirilmiştir [58].

2.3.2. Borun Türkiye için önemi

Dünya bor rezervleri hakkında güvenilir kesin bir rakam vermek güç olmakla birlikte, dünyadaki toplam rezerv, B_2O_3 olarak, 1.241×10^9 tondur [59]. Türkiye dünya bor rezervlerinin %72'sine sahiptir ve dünya üretiminin %32'sini gerçekleştirmektedir. Ülkemiz 2.5 milyar tonluk kamulaştırılmış bor rezervi alanlarıyla dünyanın 450-500 yıllık ihtiyacını karşılayabilecek durumdadır [58]. Diğer önemli rezervler ABD ve Rusya'dadır. Ayrıca ekonomik açıdan en değerli boratlar olan boraks, kolemanit ve üleksit ülkemizde büyük miktarlarda yer almaktadır [60]. Bor mineralleri bazı alanlarda ham bor olarak kullanılmakta ise de

genel olarak rafine bor bileşiklerine ve özel bor ürünlerine dönüştürüldükten sonra kullanılmaktadırlar. Bor minerallerinin çıkarılması, üretimi ve pazarlanması yasayla Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğüne bırakılmıştır. Bor ve ürünlerinin yurtiçi tüketiminin artırılması ve yeni kullanım alanları bulunması amacıyla 2004 yılında Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü (BOREN) kurulmuştur. Ülkemizdeki bor mineralleri Batı Anadolu'da olup, Eskişehir, Balıkesir, Kütahya ve Bursa çevrelerinde çıkartılmaktadır. Bugün stratejik bir değeri olan bor geleceğin Türkiye'sinde de ekonomik anlamda çok önemli bir rol oynayacaktır [61]. Bu nedenle borun kullanım alanının yaygınlaştırılmasına yönelik çalışmaların yüksek katma değere sahip olduğu düşünülmektedir.

2.3.3. Borun kimyasal özellikleri ve kullanım alanları

Yeryüzünün 51. yaygın elementi olan bor, toprak, kayalar ve suda yaygın olarak bulunan bir elementtir. Toprağın bor içeriği genelde ortalama 10-20 ppm, deniz suyunun 0.5-9.6 ppm, tatlı suların ise 0.001-1.5 ppm aralığındadır[62]. Kimyasal sembolü (B) dir ve periyodik cetvelin 3A grubunda bulunup, bu grubun metal olmayan tek elementidir. Atom numarası 5, atom ağırlığı 10.82 ve erime noktası $2190\pm 20^{\circ}\text{C}$ ' dir. İzotopları olan B_{10} ve B_{11} ' in doğada bulunma yüzdeleri sırasıyla %19.57, %80.43'dür [58]. Bor, kimyasal ve fiziksel olarak çok sayıda farklı özelliklere sahiptir. Elektron yapısı ve periyodik tablodaki yeri nedeniyle, bor içeren moleküller elektrofildir ve izoelektronik olan trigonal düzlemsel yapıya sahiptir. Bor ile yapılan fazladan bağlarla oluşan bileşikler anyonik, tetrahedral olmaktadır ve nükleofil gibi davranmaktadır. Trigonal bor bileşikleri sulu çözeltilerde aşırı reaktif olmalarına rağmen, tetrahedral türler kimyasal olarak oldukça karardır [63].

Doğada 200'e yakın bor bileşiği bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın olanları ve ticari önemi olanlar; Boraks $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, Kernit $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Üleksit $\text{NaCaB}_5\text{O}_9 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, Probertit $\text{NaCaB}_5\text{O}_9 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Kolemanit $\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$, Hidroborasit $\text{CaMgB}_6\text{O}_{11} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve Pandermit $\text{CaB}_{10}\text{O}_{19} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ olarak Devlet Planlama Teşkilatı tarafından belirlenmiştir (1995). Üleksit'ten türetilen borik asit ve boraks çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Borik asit; bir Lewis asididir, hidroksil iyonunu tutar, protonları bırakır. Ayrıca, borun organik bileşiklerle yaptığı kompleksler, hidroksil grubu ihtiva eder ve böylece; şekerler, polisakkaritler, adozin-5-fosfat, piridoksin, riboflavin, dehidroaskorbikasit ve piridin nükleotidleri ile etkileşime girebilir [58, 64].

Çok çeşitli sektörlerde kullanılan bor mineralleri ve ürünlerinin kullanım alanları giderek artmaktadır. Üretilen bor minerallerinin %10'a yakın bir bölümü doğrudan mineral olarak tüketilirken geriye kalan kısmı bor ürünleri elde etmek için kullanılmaktadır. Bor mineralleri ve ürünleri, cam sanayi, seramik sanayi, temizleme ve beyazlatma sanayi, yanmayı önleyici maddeler, tarım, metalurji sanayi, nükleer sanayi ve tıp alanlarında kullanılmaktadır [64].

Cam sanayiiinde; bor, ergimiş haldeki cam ara ürününe katıldığında onun viskozitesini artırıp, yüzey sertliğini ve dayanıklılığını yükselttiğinden ısıya karşı izolasyonun gerekli görüldüğü cam ürünlerine katılmaktadır [65].

Seramik sanayiiinde; borla kaplanan emayenin paslanmasının önlenmesi ve seramiği çizilmeye karşı dayanıklı hale getirmesi için kullanılmaktadır [66].

Temizleme ve beyazlatmada; sabun ve deterjanlarda, mikrop öldürücü, su yumuşatıcı ve beyazlatıcı etkisi nedeniyle tercih edilmektedir [65].

İnşaat ve çimento sanayiiinde; çimento için dayanıklılık artırıcı ve izolasyon özelliği sağlaması açısından kullanılmaktadır. Borlu çimento depreme dayanıklı ve maliyeti düşük bir üründür. Genellikle baraj ve dayanıklı karayolu yapımı gibi mukavemet açısından yüksek düzeyde dayanıklılık ve sağlamlık gerektiren yapılarda kullanılmaktadır [67].

Yanmayı önleyici/geciktirici madde olarak ise; bor, erime noktasının çok yüksek olması ve bu nedenle yanmaya karşı oldukça dayanıklı olması nedeniyle kullanılmaktadır [66].

Nükleer uygulamalarda, atom reaktörlerinde borlu çelikler, bor karbürler ve titan-bor alaşımları kullanılır. Paslanmaz borlu çelik, nötron absorbanı olarak tercih edilmektedir. Yaklaşık her bir bor atomu bir nötron absorbe etmektedir. Atom reaktörlerinin kontrol sistemleri ile soğutma havuzlarında ve reaktörün alarm ile kapatılmasında (B^{10}) bor kullanılır [65].

Enerji sektöründe; bor ve bor bileşiklerinin, hidrojen, yakıt pili ve araç motor teknolojilerinde enerji kaynağı olarak potansiyel kullanımı mevcuttur. Konvansiyonel enerji kaynaklarının hızlı bir şekilde tükenmesi bor madenini geleceğin enerji kaynağı adayı olarak güçlü bir konuma getirmiştir [68].

Tarım alanında; bor mineralleri bitki örtüsünün gelişmesini artırmak veya önlemek amacıyla, biyolojik gelişim ve kontrol kimyasallarında bakterisit ve fungisit olarak küflenmeyi önlemek amacıyla ve yavaş eriyen gübre üretiminde kullanılmaktadır. Bor, değişken ölçülerde, birçok bitkinin temel besin maddesi olması nedeniyle kullanılmaktadır. Özellikle eksikliği, anormal büyümeye, meyvelerin ya da yaprakların bozulmasına veya renklerini yitirmesine, az tohum hasatının ortaya çıkışına ve bunların sonucu olarak gelişen bölgelerin yok oluşu ile birlikte bitki kaybına neden olmaktadır [69].

Makine ve metalurjide; boratlar, yüksek sıcaklıkta düzgün, yapışkan, koruyucu ve temiz, çapaksız bir sıvı oluşturma özelliği nedeniyle, özellikle demir dışı metal sanayiinde cüruf oluşturu ve ergitmeyi hızlandırıcı madde olarak kullanılır. Boratlar özellikle çeliğin sertliğini artırıcı madde olarak kullanılmaktadır [70]. Aynı zamanda demir esaslı malzemelerden yapılan makine parçalarında elemanların aşınmaya, yüzey basıncına ve korozyona karşı dirençli olması için yüzeylerinin sertleştirilmesinde de kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, korozyon deneylerine tabi tutulan borlanmış numunenin, borlanmamış numuneye oranla yaklaşık 8 kat daha fazla korozyon dayanımı gösterdiği kanıtlanmıştır [71].

2.3.4. Bor ve sağlık

2.3.5. Borun vücuttaki etkileri

Bor elementinin 1923 yılında bitkiler için esansiyel olduğu kabul edilmiş, hayvanlar ve insanlar için de esansiyel olabileceğine ilişkin bulgulara da yakın zamanda ulaşılabilmektedir [72]. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre insan vücuduna günlük yaklaşık olarak 0.44 µg hava yoluyla, 0.2–0.6 mg içme suyuyla ve 1.2 mg beslenme yoluyla bor girmektedir. Meyveler, yeşil sebzeler, mantarlar, baklagiller ve kabuklu yemişler bor bakımından zengin besinlerdir. Balık, et ve süt ürünleri ise borca fakir besinler arasındadır.

Vücuda alınan borun neredeyse tamamı sindirim ve solunum sisteminden absorbe edilirken çok az bir kısmı da deri yoluyla alınır. İnsan vücudundaki organ veya sıvıların normal bor konsantrasyonları Çizelge 2.2'de verilmiştir. Sıçanlar üzerine yapılan bir araştırmada, günlük 9,000 ppm borik asit ile beslenen hayvanların vücudundaki bor dağılımı incelenmiş ve en çok birikimin kemiklerde olduğu sonucuna varılmıştır [73].

Çizelge 2.2. İnsanlarda organ veya sıvıların normal bor konsantrasyonu[74].

Doku	Bor Konsantrasyonu (µg/g)
^a Beyin	0.87
^a Kalp	0.59
^a Böbrek	1.27
^a Karaciğer	2.25
^a Pankreas	0.51
^a Dalak	3.95
^b Kemik	1.60
^b Saç	1.05
^b Tırnak	15.00
^b Sereprospinal Sıvı	1.15
^b Sinoviyal sıvı	30.00
^b Tükrük	4.40

^aKuru Ağırlık^bYaş Ağırlık

Dokulara ya da vücut sıvılarına geçen bor, çoğunlukla Borik asit B(OH)₃ şeklinde bulunurken az miktarda da B(OH)₄⁻ anyonları şeklinde bulunur. Borik asit doğal bir bileşik olup, sulardan, sebzelerden ya da diğer yiyeceklerden beslenme yoluyla alınabilir [75]. Dışarıdan alınan boratlar, emilimleri sırasında mukozal yüzeylerde fizyolojik pH nedeniyle borik asite dönüştürülür. Borik asitin farklı biyolojik moleküllerle etkileşime girebildiği bilinmektedir. Deneysel çalışmalar borik asitin hidroksil, amino ve tiyol gruplarına karşı ilgisini ortaya koymuştur.

Vücuda hangi yolla alınmış olursa olsun borun %90'dan fazlası ilk 24 saat içerisinde idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. Kalan kısım ise daha çok kemik, tırnak ve kıllarla, karaciğer ve dalak gibi organlarda birikmektedir. Araştırmalar borun toksik etkisinin çok düşük olduğunu göstermektedir. Borun akut etkisi 15-30 g boraks veya 2-5 g borik asit doğrudan alınırsa ortaya çıkabilir. Bazı kaynaklar uzun süre bora maruz kalmanın erkeklerde kısırlığa neden olduğunu iddia etmektedir, ancak ülkemizde ve dünyada yapılan pek çok araştırma borun kısırlığa yol açmadığı yönündedir [74].

Bor, mineral ve hormon metabolizmasında, hücre membran fonksiyonlarında ve enzim reaksiyonlarında rol oynar. Hücre dışı matris üretimini etkileyerek yara iyileşmesini hızlandırır. Beslenme yoluyla alınan bor, plazma lipid seviyesinin düşmesinde de rol oynayabilmektedir. Aynı zamanda kalp hastalıkları, osteoporoz

ve artrit riskini azalttığı düşünülmektedir [75]. Çalışmalar borun insanın algılama yeteneğini ve beyin fonksiyonlarını da etkilediğini göstermektedir [76]. Bor immün sistem ve yangısal olaylarda da etkilidir. Bai ve Hunt [45] bor yetersizliğinde sıçanların bakteriyel antijenlere karşı oluşturdukları immün cevabın baskılandığını ortaya koymuşlardır. Benderdour ve ark. [77] tavuk embriyolarının pelvik kasi üzerinde yürütülen çalışmada borik asitin proteoglikan, protein ve kollajen sentezi üzerine etkisini değerlendirmişler ve *in vitro* da kültür ortamında salımlarının arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca borik asit uygulanan hücrelerden TNF- α salındığı da gösterilmiş ve bunun yara iyileşmesini hızlandırdığı belirtilmiştir. Yapılan birçok çalışma ise, borun steroid hormon metabolizması üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Borun östrodiol ve testesteron gibi hormonların sentezindeki hidroksilasyon basamağında etkili olduğu düşünülmektedir [55]. Nielsen'in hipotezine göre bor, steroid hormonlarının sentezinde ihtiyaç duyulan bir elementtir. Örneğin, bir veya daha fazla hidroksilasyon basamağı içeren steroid hormonlarından D vitamini, testesteron ve 17-beta-östrodiol biyosentezinde Lewisasidi rolü oynayarak steroid yapılarına hidroksilgrubunun eklenmesini kolaylaştırıcı etki yapar. Ayrıca hormonların hızlı bir şekilde inaktif olmasını önleyici bir etki de gösterir [78].

DeneySEL çalışmalar borun prostat kanserine karşı koruyucu özellikte olduğunu da göstermiştir. Araştırmacılar, düşük konsantrasyonlarda borik asitin, prostat spesifik antijenlerin proteolitik etkisini kısmen baskıladığını ve böylece bu antijenler üzerindeki düzenleyici etkisiyle borun prostat kanserinin gelişme riskini azalttığını bildirmişlerdir. Prostat kanser hücre hattıyla yapılan çalışmada, 60-100 μ M borik asit hücre çoğalmasını engellemiştir [79]. Borun sağlık sektöründeki en yaygın kullanımı beyin kanserlerinin tedavisinde kullanılan Bor Nötron Yakalama Terapisidir (BNCT). BNCT iki bileşenli bir radyasyon tedavi yöntemidir ve çoğunlukla etraftaki sağlıklı dokuya zarar vermeksizin sadece tümörlü hücrelerin yok edilmesini sağlar [80].

İnsan metabolizmasında nasıl bir yol izlediği henüz tam bilinmeyen bor için iki hipotez öne sürülmüştür. Birinci hipotez borun hücre membranı fonksiyonu, stabilitesi veya yapısında önemli görevleri olduğunu savunmaktadır. Düzenleyici anyon ve katyonların transmembranal taşınmasını ve membranlar arası haberleşmeyi sağlaması ile hormonal aktivitelere duyarlı olması sonucu bu

görevleri gerçekleştirebilmekte olduğu düşünülmektedir. İkinci hipotez ise borun metabolik yollarda bazı anahtar enzim reaksiyonlarını yarışmalı inhibisyon yoluyla etkileyen negatif bir düzenleyici olduğunu savunmaktadır [81, 82].

2.3.5.1. Borun kemik doku üzerine etkileri

Bor, magnezyum, vitamin D ve kalsiyum gibi kemik sağlığı üzerinde önemli etkileri olan mikro besinlerin metabolizmasında görev almaktadır. Buna bağlı olarak bor, osteoporozun önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Hunt ve Nielsen [83] tavuklarda beslenme ile yetersiz bor alımının yetersiz magnezyum alımına da neden olduğunu bulmuşlardır. Uygun miktarda bor alımı plazma kalsiyum ve magnezyum seviyelerini yükseltmiştir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmalarında borun vitamin D üzerine de dolaylı bir etkisinin olduğu sonucuna varmışlardır [84].

Bor, organik bileşiklerdeki hidroksil gruplarıyla kompleks oluşturabilme özelliğinden dolayı kortikosteroidleri oluşturabilir ve böylece romatoid artrit belirtilerini hafifletir. Ayrıca artritlik kemiklerin sağlıklı kemiklerden daha az bor içerdiği tespit edilmiştir [56]. Newnham ve ark. [85] tarafından yapılan araştırmalarda artritlik kemiklerde bor miktarı 3 ppm iken sağlıklı kemiklerde 56 ppm civarında bulunmuştur. En yaygın olarak borun osteoartrit, osteoporoz ve romatoid artritin tedavilerinde kullanımı gündeme gelmektedir. Günlük 3 mg bor alımının menapoz sonrası kadınlarda östrojen etkisini arttırdığı ve bu etkinin osteoporoz tedavisinde önemli olduğu vurgulanmaktadır [86]. Demirel ve ark. [87] sıçanlardaki periodontitis modellerinde sistemik borik asitin histopatolojik ve morfometrik etkisini değerlendirdiklerinde, borun periodontal inflamasyonu ve alveolar kemik kaybını azalttığını göstermişlerdir. Eksikliğinin kemik ve kıkırdak dokularının gelişimini, organlarda bulunan kalsiyum, magnezyum seviyelerini ve alkalen fosfataz enzim aktivitesini etkilediği rapor edilmesine rağmen, borun etki mekanizması henüz bilinmemektedir.

Borun kemik doku üzerine etkisinin daha iyi anlaşılması amacıyla bazı *in vitro* hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Hakkı ve ark. [15] tarafından yapılan çalışmada borun MC3T3-E1 osteoblastik hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada çeşitli bor dozlarında hücrelerin mineralizasyon karakteristikleri incelenmiş ve sonuç olarak borun özellikle osteoporoz gibi önemli kemik kaybı belirtilerine karşı çok faydalı olabileceği öngörülmüştür. Wu ve ark. [88]

tarafındanyapılan çalışmada da bor ve dekzametazon içeren doku iskelelerinde osteojenik aktivitenin ve hücre çoğalmasının arttığı görülmüştür. Ying ve ark. [89] borun kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasına etkisini, kültür ortamına farklı derişimlerde bor ekleyerek incelemiştir. 4, 7 ve 14. günlerde yapılan analizler sonucunda 1,10 ve 100 ng/mL bor eklenen gruplarda hücre çoğalmasının kontrol gruplarıyla bir farklılık göstermediği ve 1000 ng/mL bor eklenen hücrelerin proliferasyonunun da inhibe olduğu görülmüştür. Ancak osteojenik farklılaşma göstergesi olan alkalen fosfataz aktivitesi 10 ve 100 ng/mL bor uygulanan gruplarda anlamlı derecede yükselmiştir. Bu sonuçlar gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları analizleri ile de desteklenmiştir.

Literatür incelendiğinde beslenme yoluyla bor alımının kemik dokuya etkisi kısmen anlaşılmış olmasına rağmen, bor ve bileşiklerinin hücre kültür ortamındaki etkinlikleri henüz tam olarak bilinmemektedir.

2.4. Hidroksiapatit

Biyomalzeme olarak kullanımı dişçilikte ve implant kaplamalarında da sıklıkla tercih edilen hidroksiapatitler (HAp), apatit yapısında olup genel formülü $M_{10}(PO_4)_6X_2$ (M: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , K^+ ve X: F_2^- , Cl_2^- , Br_2^- , $(OH)_2$, CO_3^{2-}) olarak bilinmektedir. Saf hidroksiapatitin formülü ise $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 'dir[90]. Yapılan araştırmalar kemik yapısının % 60 oranında HAp ve % 20 oranında da kollajen fiber içermekte olduğunu göstermektedir[91]. Stokiyometrik HAp'nin Ca/P molar oranı 1.67'dir. Doğal kemiğin inorganik bileşeni stokiyometrik olmayan apatit yapısındadır. Biyolojik apatitler zayıf kristalin yapıdadır ve katyonik ve anyonik iyonlar hidroksiapatitin kristal yapısına katılmaktadır. Biyolojik hidroksiapatitin yapısına en çok katılan iyon karbonat (CO_3^{2-})'tır ve kemikte ağırlıkça %5-8 arasında bulunur. CO_3^{2-} , hidroksiapatit yapısında bulunan bütün hidroksil (OH^-) iyonları ve bazı fosfat (PO_4^{3-}) iyonlarıyla yer değiştirebilir. OH^- iyonu ile yer değiştirmesi sonucu A tipi hidroksiapatit oluşurken, PO_4^{3-} iyonlarıyla yer değiştirmesi sonucu B tipi hidroksiapatit oluşmaktadır. Kemikte ise B tipi hidroksiapatit yaygın olarak bulunur. Hidroksiapatitin yapısına magnezyum iyonları katılması ise özellikle osteogenez sırasında artmaktadır. Kemiğin yapısında bulunan inorganik bileşenler ve ağırlıkça yüzdeleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. İnsan vücudunda kemik dokunun inorganik bileşimi [92].

Kemiğin inorganik bileşimi	% ağırlık
Kalsiyum, Ca ²⁺	34.80
Fosfor, P	15.20
Ca/P (molar)	1.71
Sodyum, Na ⁺	0.90
Magnezyum, Mg ²⁺	0.72
Potasyum, K ⁺	0.03
Karbonat, CO ₃ ²⁻	7.40
Flor, F ⁻	0.03
Klor, Cl ⁻	0.13
Pirofosfat, P ₂ O ₇ ⁴⁻	0.07
Toplam inorganik	65.00
Toplam organik	25.00
H ₂ O	10.00
Eser elementler: B ³⁺ , Sr ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺	

Kemiğin önemli bileşenlerinden olan kalsiyum fosfatlar biyoaktif ve biyouyumlu özelliğe sahip olmalarından ötürü, kimya, biyoloji, tıp, dişçilik ve jeolojiyi de kapsayan disiplinler arası alanlarda 20 yıldan bu yana kullanılmaktadır. HAp'in gübre ve ilaç üretim endüstrisi, protein kromatografi uygulamaları, su arıtma prosesi ve kemik ve diş onarımı gibi birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Sağlık alanındaki kullanımı, biyoaktif olmasının yanı sıra aynı zamanda osteokondüktif, non-toksik ve non-immunojenik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. HAp biyoseramikleri sıklıkla implant kaplama malzemesi olarak yumuşak doku ile implant arasında bir arayüzey oluşturup implantın kaymasını engellemektedir. Hidroksiapatit kemik dolgu materyali olarak toz halde ya da gözenekli blok şeklinde kullanılır [90, 93]. HAp'nin gözenekli yapısı antibiyotik, hormon, enzim, antikör parçaları ve steroidler gibi çeşitli farmakolojik maddelere yüksek bağlanma afinitesi gösterir. Bu nedenle, sentetik HAp'in kullanımı birçok klinik uygulamada, sürekli salım kapasitesiyle osteomyelit, osteoporoz ve kemik kanseri gibi hastalıklarda, kemikte bölgesel olarak oluşan hasarların doldurulması ihtiyacını önemli ölçüde karşılamaktadır [7].

Kalsiyum fosfat seramikleri diğer malzemelerle karşılaştırıldığında, serum proteinlerine yüksek bir bağlanma kapasitesine sahiptirler. Proteinlerin kalsiyum

fosfatlara bağlanması elektrostatik olarak gerçekleşir ve kalsiyum fosfat yüzeylerindeki protein bağlanma bölgeleri Ca^{+2} ve PO_4^{3-} iyonlarıdır. Protein bağlanmasını etkileyen önemli bir etken de iyonik güç ve ortam pH'ıdır [94].

2.4.1. Hidroksiapatit üretim yöntemleri

Literatürde sentetik HAp sentezi için, sol-jel yaklaşımı, sulu çözeltilerden çöktürme yöntemi, hidrotermal yöntem, mikrodalga-hidrotermal yöntem, çoklu emülsiyon yöntemi, elektrokristalizasyon yöntemi ve biyomimetik çöktürme yöntemi gibi birçok yöntem bulunmaktadır.

Sol-jel yöntemi, işleme parametrelerinin sıkı bir şekilde kontrol edilebilmesi nedeniyle nanofazik HAp'nin sentezinde etkili bir yöntemdir. Yöntem, kalsiyum ve fosforun moleküler düzeyde karıştırılmasıyla, oluşan HAp'nin kimyasal yapısını önemli ölçüde geliştirmeyi sağlar. Apatit yapısını oluşturmak için gerekli sıcaklık ve kimyasal aktivite, büyük oranda başlangıçta kullanılan kimyasalların doğal yapısına bağlıdır. Çok sayıda fosfor ve kalsiyum öncüsünün kombinasyonları HAp'nin sol-jel sentezinde kullanılmaktadır. Balamurugan ve ark. [95] kalsiyum ve fosfor kaynağı olarak sırasıyla $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ve trietil fosfatı $Ca/P=1.67$ stokiyometrik oranında kullanmışlar ve üretilen HAp tozlarını kurutarak $900^\circ C$ ' a kadar değişen sıcaklıklarda kalsine etmişlerdir. Brendel ve ark. [96] öncü olarak fenildiklorofosfit $[C_6H_5PCl_2]$ ve $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ kullanarak HAp sentezini düşük sıcaklıkta gerçekleştirmişlerdir. Ancak oluşan HAp'nin safsızlığının fazla ve kristalinitesinin düşük olduğunu belirlemişler ve sıcaklığı $900^\circ C$ 'ye kadar yükseltmenin daha saf ve kristal HAp üretimi ile sonuçlandığını bildirmişlerdir.

Çöktürme tekniği, HAp sentezi için en yaygın olarak araştırılan ve güncel olan yöntemdir. Bu yöntem aynı zamanda ıslak çöktürme, kimyasal çöktürme ya da sulu çöktürme olarak adlandırılır. Diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilmesinin nedeni organik çözücülere ihtiyaç duyulmadan yüksek miktarlarda ve düşük maliyetle üretim yapılabilmesidir [7]. Ancak bu yöntemde üretilen partiküller büyük boyut ve boy dağılımlı olmakta, ayrıca bir araya gelerek topaklanmaktadır [93]. Chen ve ark. [97] tarafından yapılan çalışmada kalsiyum fosfat ($Ca(NO_3)_2$) ve amonyum nitrat ($NH_4H_2PO_4$) çözeltileri $pH > 10$ ortamında ve $Ca/P=1.67$ stokiyometrik oranında etkileştirilerek HAp tanecikleri sentezlenmiştir. Geçirmeli elektron mikroskopu (TEM) ile yapılan analizler sonucu eni 20-30 nm, boyu 50-60

nm olan HAp parçacıklarının oluştuğunu belirlemişlerdir. Bouyer ve ark. [98] kalsiyum hidroksit (Ca(OH)_2) ve ortofosforikasiti (H_3PO_4) reaksiyonda başlangıç maddesi olarak kullanmışlar ve yan ürün olarak sadece su oluştuğunu, herhangi bir yabancı ürünün oluşmadığını göstermişlerdir. Üretilen HAp partiküllerinin büyüklüğü, şekli ve yüzey alanı, ortama eklenen ortofosforikasitin oranına ve reaksiyonun sıcaklığına oldukça duyarlıdır.

Hidrotermal sentez, seramik malzemelerin çözüldüğü doğrudan kristalizasyonu için sulu ortamda, belirlenen basınç ($P > 100 \text{ kPa}$) ve sıcaklıklarda ($T > 25^\circ\text{C}$) tek ya da heterojen reaksiyonların kullanıldığı bir süreçtir. Bununla birlikte, hidrotermal işlemde hidrotermal sıcaklığın ve basıncın artırılmasıyla çökeltinin Ca/P oranını değiştirmek mümkündür. Wang ve ark. [99] çalışmalarında hidrotermal yöntemle ve suda çözünebilen bir yüzey aktif madde olan heksadesiltrimetil amonyum bromürü kullanarak çeşitli morfolojilerde HAp nanotaneçiklerini sentezlemişlerdir. Küçük çaplı (~27 nm) ve küresel taneçikler 90°C , $\text{pH}=13$ ve 20 saat çalışma koşullarında elde edilirken, 1125 nm'den uzun fiberler 150°C , $\text{pH}=9$ ve 20 saatte elde edilmiştir.

Mikrodalga ışıma yöntemi ile hidrotermal yöntemi birleştiren Han ve ark. [100] nanoboyutlu HAp tozlarını, 600 bar ve 300°C 'de öncü malzeme olarak H_3PO_4 ve Ca(OH)_2 'yi kullanarak sentezlemişlerdir. Uygulanan mikrodalga güçlerini ve Ca/P molar oranını, sentezde değişken parametreler olarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak, 450W mikrodalga gücünde ve 1.57 Ca/P oranında sentezlenen ürünler arasında HAp dışında farklı kalsiyum fosfat fazlarının oluştuğunu saptamışlardır. Ancak mikrodalga gücü 550W ve Ca/P oranı 1.67 iken iki tip morfolojiye sahip monofazik HAp oluştuğunu belirlemişlerdir: Birincisi; 4-15 nm genişlik ve 20-50 nm uzunluğunda iğne şeklinde, diğeri 10-30 nm çapında küreseldir. Kumar ve ark. [101] karbonatlı hidroksiapatit sentezi için, kalsiyum hidroksit (Ca(OH)_2) ve diamonyum hidrojen fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) bileşiklerini öncü olarak kullanmışlar ve mikrodalga yardımıyla (800W, 2.45 GHz) B tipi karbonatlı apatit elde etmişlerdir. Geleneksel hidroksiapatit üretim yöntemlerinin zaman ve enerji kaybına neden olduğuna dikkat çekmişler ve mikrodalga ışıma ile daha kısa sürede ve etkili bir ısıtma ile hidroksiapatit üretiminin gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Nazir ve ark. [102] ıslak kimyasal yöntem ile mikrodalga ışımasını birleştirerek, kalsiyum nitrat tetrahidrat ($\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve diamonyum hidrojen fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)

öncüllerinden HAp üretimini gerçekleştirmişlerdir. Karışıma uygulanan mikrodalga enerjisi sayesinde, kalsiyum ile etrafındaki hidrasyon küresi arasındaki bağların gücü azaltılıp sulu çözeltilerde apatit oluşumu için gerekli ön koşul sağlanırken, HAp yapısı içindeki hidroksil iyonu daha fazla mikrodalga absorblanmasına neden olarak HAp oluşumunu hızlandırmıştır. Rameshbabu ve ark. [103] kemiğin yapısında bulunan iki önemli kalsiyum fosfat fazı olan HAp ve β -TCP fazlarını mikrodalga yardımıyla nanoboyutta sentezlemişlerdir. Kalsiyum hidroksit ve diamonyum hidrojen fosfat bileşikleriyle elde edilen sulu çözeltilere 1100 W gücünde mikrodalga uygulayarak hızlı ve etkin bir şekilde ısıtma sağlamışlar ve partikül büyüklüğü 20 nm civarında olan bifazik kalsiyum fosfatları elde etmişlerdir.

Çoklu emülsiyon yöntemi ile Kimura [104] HAp sentezi yaklaşımlarına ara yüzey reaksiyonu ile bir alternatif geliştirmiştir. Çoklu emülsiyon su, yağ, su (w/o/w) emülsiyonudur, iç sulu faz olarak dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) çözeltisi, yağ fazı olarak benzen ve dış sulu faz olarak $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ kullanılarak yapılmıştır. Ara yüzey reaksiyonu 323 K'de 24 saatte gerçekleşir ve monofazik HAp başlangıç pH'ı 12 iken sentezlenmiştir. Sentezlenen ürünler 3 μ m'den küçük gözenekli kürelerden oluşmuş ürünlerdir. Bu metodun avantajları, reaktör olarak, karştırmalı tankların kullanımının yeterli olması ve böylece özel bir ekipman ihtiyacı duyulmamasıdır. Ayrıca oda sıcaklığına yakın düşük sıcaklıklar reaksiyon için uygundur.

Elektrokristalizasyon yöntemi, seyreltik elektrolitlerden fizyolojik pH'ta HAp kaplamalarının sentezi için uygundur. Sentezin hızlı olması, düşük sıcaklıklarda gerçekleşebilmesi, kaplamanın kalınlığının ve kimyasal yapısının kolaylıkla kontrol edilebilmesi nedeniyle avantajlıdır. Metalik implantların kalsiyum fosfat ile kaplanması için etkili bir yöntemdir ve dolayısıyla endüstride sıklıkla tercih edilir. Xuhui ve ark. [105] yaptıkları çalışmada NaCl, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ve $CaCl_2$ elektrolitlerini kullanarak hazırladıkları çözeltinin pH'ını 7.2 olacak şekilde ayarladıktan sonra 65°C'de elektrokimyasal birikimi gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen kaplamanın karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM), X ışını kırınımı (XRD) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizleri ile yapılmıştır. Sonuç olarak bu yöntemle saf ve homojen bir kaplamanın elde edildiği, aynı zamanda yapay vücut sıvısı ile yapılan çalışma sonrasında da kaplamanın yüksek biyoaktif özellikte olduğu gösterilmiştir.

Biyomimetik yöntemde, insan vücut sıvısına benzer bir organik tuz bileşimi ile elde edilen yarı kararlı sentetik vücut sıvısı (SBF), kendiliğinden çekirdeklenme ile nano boyutlu, karbonatlı ve kemik benzeri HAp'in fizyolojik pH'ta ve sıcaklıkta oluşmasına olanak sağlamaktadır. İnsan kemiğinde doğal olarak bulunan biyolojik apatit CO_3^{2-} , Cl^- , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} gibi anyon ve katyonların az miktarlarda yapıya katılmasıyla oluştuğundan, bu yöntem kemik benzeri HAp sentezlenmesi için oldukça uygundur [6]. Diğer apatit kaplama yöntemleri ile karşılaştırıldığında, kolay ve hızlı olma, özel ekipmanlara ya da yüksek işleme sıcaklıklarına ihtiyaç duymama gibi bazı avantajları bulunmaktadır [106]. pH ve sıcaklık açısından ılımlı ortam koşulları nedeniyle, polimerler gibi sıcaklık-duyarlı ya da gözenekli implantlar gibi kompleks şekilli malzemelerin kaplanması, SBF çözeltisine daldırma ile mümkün olmaktadır [107]. Ancak, SBF'nin doygunluk seviyesi nedeniyle çökeltme hızı yavaş olmakta ve osteoindüktif materyaller üzerinde Ca/P oluşumu 2-3 hafta kadar zaman almaktadır. Bu nedenle, iyon konsantrasyonu kan plazmasından n=1.5, 2, 5, 10 katı kadar fazla olan çeşitli SBF çözeltileri hazırlanmış ve benzer kalınlıkta HAp kaplaması 2-6 saatler arasında gerçekleştirilebilmiştir [10].

Yapay vücut sıvısı ilk olarak Ringer, Earle ve Hanks'ın hazırladıkları dengeli tuz çözeltileri ile insan plazması ya da hücre dışı sıvısının taklit edilmesiyle başlamıştır [108]. SBF çözeltileri başta kısmen düşük kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonları ile hazırlanmış ve çözeltinin pH değerinin fizyolojik değer 7.4'te olması için TRIS ve HEPES gibi organik tamponlar kullanılmıştır. Ancak bunların dezavantajları vardır ve normalde kan plazmasında bulunmazlar [9]. Çizelge 2.4'te çeşitli çözeltiler ve SBF'lerin iyon derişimleri, kan plazması ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 2.4. İnsan plazmasının ve sentetik çözeltilerin iyon derişimleri, mM.

	Kan Plazması	Ringer	EBSS ^a	HBSS ^b	Kokubo c-SBF ^[109]	Taş-SBF ^[110]	Bigi-SBF ^[111]	Kokubo r-SBF ^[112]
Na⁺	142.0	130	143.5	142.1	142.0	142.0	141.5	142.0
K⁺	5.0	4.0	5.37	5.33	5.0	5.0	5.0	5.0
Ca²⁺	2.5	1.4	1.8	1.26	2.5	2.5	2.5	2.5
Mg²⁺	1.5	-	0.8	0.9	1.5	1.5	1.5	1.5
Cl⁻	103.0	109.0	123.5	146.8	147.8	125.0	124.5	103.0
HCO₃⁻	27.0	-	26.2	4.2	4.2	27.0	27.0	27.0
HPO₄²⁻	1.0	-	1.0	0.78	1.0	1.0	1.0	1.0
SO₄²⁻	0.5	-	0.8	0.41	0.5	0.5	0.5	0.5
Ca/P	2.5	-	1.8	1.62	2.5	2.5	2.5	2.5
Tampon	-	-	-	-	TRIS	TRIS	HEPES	HEPES
pH	7.4	6.5	7.2-7.6	6.7-6.9	7.25-7.4	7.4	7.4	7.4

^aEBSS: Earle'in dengeli tuz çözeltisi. ^bHBSS: Hanks'in dengeli tuz çözeltisi

Hazırlanan yapay vücut sıvısı gibi çözeltilerin aşırı doygunluğuna bağlı olarak kalsiyum fosfatlar termodinamikaçından kararsız amorf kalsiyum fosfattan başlayarak, dikalsiyum fosfat dihidrat(CaHPO₄.2H₂), oktakalsiyum fosfat (Ca₄H(PO₄)₃.2.5H₂O) ve en kararlı mineral fazı hidroksiapatiti (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) oluşturabilir [90]. Kalsiyum fosfat tuzları arasında, termodinamik olarak en kararlı faz olan hidroksiapatitin sentezi sırasında oluşabilecek CaP tuzları Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. Kalsiyum fosfat tuzları [92].

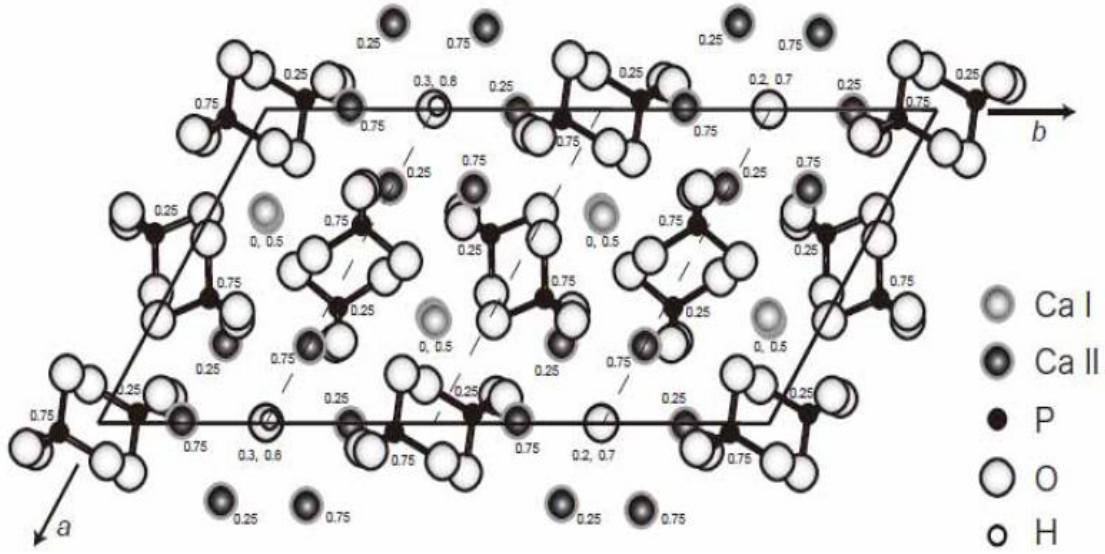
Bileşğin adı	Sembolü	Formülü	Ca/P
Monokalsiyum fosfat monohidrat	MCPM, MCPH	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5
Monokalsiyum fosfat anhidroz	MCPA, MCP	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5
Dikalsiyum fosfat dihidrat	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1.0
Dikalsiyum fosfat anhidroz	DCPA, DCP	CaHPO_4	1.0
Oktokalsiyum fosfat	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
α -Trikalsiyum fosfat	α -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
β -Trikalsiyum fosfat	β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Amorf kalsiyum fosfat	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.2-2.2
Hidroksiapatit	HA, HAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67

Polimer malzemeler süper doymun SBF çözeltilerine daldırıldığında, çözeltideki kalsiyum ve fosfat iyonları yüzeyde apatit çekirdeklerini oluşturmakta ve yüzeyde homojen yapıda ve yoğun bir kaplama meydana gelmektedir. Apatit kaplamanın kalınlığı SBF ile ikinci muamele sonrasında daha da artabilmektedir. Apatit büyümesinin oranı, ortam sıcaklığının artmasıyla doğru orantılıdır [113].

2.4.2. İyon katkılı hidroksiapatitler

Sentetik hidroksiapatitleri de içine alan seramikler, biyouyumlulukları son derece yüksek olan ve korozyona dayanıklı malzemelerdir. Fakat bu avantajlarının yanısıra, kırılğan ve işlenmesi zor malzemelerdir. Aynı zamanda yüksek yoğunluklu, zayıf mekanik dayanıma sahip, esnek olmayan malzemelerdir. Homojen özellik gösteren ve kullanım açısından dezavantajlara sahip olan tüm bu malzeme gruplarına alternatif olarak kompozit malzemeler geliştirilmiştir ya da iyon katkılı HAp üretimi gündeme gelmiştir [93].

Biyolojik HAp yapısında Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , F^- , Cl^- ve CO_3^{2-} gibi pek çok sayıda iyon yer almaktadır. Yığın özellikler, mekanik özellikler, biyouyumluluk ve biyoaktivite özellikleri yönünden çok daha faydalı ürünler geliştirebilmek için farklı iyonlar saf HAp'nin yapısına eklenebilir [8]. HAp'nin osteokondüktif özelliğini arttırmak, yoğunluğunu teorik yoğunluğa yaklaştırmak, tane boyutunu küçültmek, bozunma hızını değiştirmek, sinterleme özelliklerini ve kafes parametrelerini değiştirmek, farklı fazların oluşmasını engellemek amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Şekil 2.5'te hidroksiapatitin kristal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.5. Hidroksiapatitin kristal yapısı.

Metal iyonlarının vücuttaki, özellikle de kemiğin oluşumu, düzenlenmesi ve yapısal bütünlüğünün sürdürülmesi üzerindeki rolü henüz yeni yeni anlaşılmaktadır. Çinko gibi bazı iyonların rolleri tam olarak bilinmesine karşın kemik oluşumu üzerinde etkisi olduğu bilinen diğer iyonların mekanizması bilinmemektedir. Çalışmaların büyük bir kısmı hücre kültür ortamlarında bu iyonların düşük dozlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Ancak bu iyonların sürekli salınması hücrelerde tamamen farklı bir hücre cevabını da başlatabilir. Lakhar ve ark. [114] terapötik iyon olarak bilinen kalsiyum, çinko, magnezyum, stronsiyum, titanyum, bakır, bor ve fosfat gibi iyonların hangi sistemlerden salınımının daha uygun ve daha hızlı doku cevabını sağlayabileceğini değerlendirmiştir. Terapötik iyonların kontrollü salımı için kalsiyum-fosfat biyoseramikleri, silika temelli ve fosfat temelli camlar gibi sayısız sistemin geliştirilmesinin amacı kemik yenilenmesine pozitif katkının sağlanmasıdır. Bu anlamda yapılan ilk çalışmalar kalsiyum fosfat temelli biyoseramiklerin iyon taşıyıcısı olarak kullanılmasının kemik oluşumu üzerinde olumlu etki yarattığına dair ipuçları vermiştir. Apatitler, kemiğin doğrudan doğal ve sentetik apatit yapısına bağlanabilmesi, kemik iyileşmesini desteklemesi ve hidroksiapatitin yapısındaki iyonların yer değiştirebilmesi nedeniyle sözü edilen iyonlar için potansiyel bir taşıyıcıdır.

Evis ve ark. [115] çöktürme yöntemini kullanarak sentezledikleri Al^{+3} katkılı ve saf HAp'lerin sinterleme sonrası kararlılıklarını incelemiştir. Molce %2.5, 5.0 ve 7.5

Al^{3+} katkısı yapılan HAp'ler yoğunluk, gözeneklilik ve tane boyutu özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, $1300^{\circ}C$ 'de sinterlenen Al^{3+} katkılı HAp'nin tane boyutunun saf HAp'den daha küçük olduğu ve ikincil fazların oluşmaması için Al^{3+} katkısının molce %5'ten daha az olması gerektiği gösterilmiştir. Kannan ve ark. [116] tarafından yapılan çalışmada çöktürme yöntemi ile aynı anda Cl^{-} ve F^{-} katkısı yapılmıştır. Cl^{-} termal ve kimyasal stabiliteyi arttırdığı, F^{-} ise korozyona karşı direnci arttırdığı, aynı zamanda da kemik hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmasını uyardığı için tercih edilmiştir. Yapılan analizler sonucu F^{-} ve Cl^{-} iyonlarının HAp'nin yapısındaki OH^{-} iyonu ile yer değiştirdiği belirlenmiştir. Mroz ve ark. [117] çalışmalarında hidroksiapatitin yapısına katılan Mg^{2+} iyonunun osteoblast yapışması ve çoğalması üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Yapılan XRD ve FTIR analizleri ile ağırlıkça %0.6 ve 1.8 Mg^{2+} katkısı yapılan HAp'nin kristal yapısının önemli ölçüde değişmediği gösterilmiş, ancak MG-63 osteoblast hücreleri ile yapılan kültür çalışmasında hücre yapışmasını arttırdığı belirlenmiştir. Divalent ve trivalent katyonlar ilave edilen HAp'nin kimyasal yapısı ve osteoblast hücrelerinin aktivitesine olan etkisi ise Webster ve ark. [118] tarafından değerlendirilmiştir. Mg^{+2} , Zn^{+2} , La^{+3} , Y^{+3} , In^{+3} , Bi^{+3} iyonları eklenen HAp malzemelerin tane boyutu, Ca/P oranı ve bu malzemeler üzerinde yapılan hücre kültürü çalışması sonucu, +2 değerlikli iyon katkısı yapılan HAp'in tane boyutunun arttığı, +3 değerlikli iyon katkısı yapılan HAp'in ise tane boyutunun azaldığı belirlenmiştir. Ca/P oranlarının da stokiyometrik HAp'den daha fazla olduğu saptanmıştır. Hücre kültür çalışmalarında ise saf HAp ile karşılaştırıldığında +3 değerlikli iyon katkısı yapılan HAp'in hücre yapışmasını desteklediği ve osteoblastik aktiviteyi arttırdığı belirlenmiştir.

2.4.3. Bor katkılı hidroksiapatit

Literatüre bakıldığında farklı birçok iyon katkısının HAp'nin kimyasal ve fiziksel yapısına olan etkisinin incelendiği görülmüştür. Bu değerlendirmelere ek olarak son zamanlarda HAp'ye bor katkısı gündeme gelmiştir. Ancak literatürde bu konuyla ilgili olarak yapılmış çalışmalar sınırlı sayıdadır. Ayrıca biyomimetik yöntemle sentezlenen bor katkılı hidroksiapatitin hücre farklılaşması ve çoğalmasına olan etkisi bilinmemektedir. Sunulan tez çalışması kapsamında hazırlanan bor katkılı hidroksiapatit-kitosan (B-HAp/Kitosan) kompozit doku iskelelerinde bu etki incelenmiştir.

İlk kez, bor ihtiva eden Ca apatit malzemeler, 1988 yılında Ito A. ve ark. [119] tarafından sentezlenmiştir. Sentezlenen apatitin formülü $Ca_{9.64}(P_{5.73}B_{0.27}O_{24})(BO_2)_{0.73}$ olarak verilmiştir. Bu çalışmaya göre Ca-B-apatit yapılarında, hem BO_2^- hemde BO_3^{3-} grubu var olmasına rağmen BO_4 grubunun olmadığı belirtilmiştir.

Ternane ve ark.[120] tarafından katı hal reaksiyonu ile sentezlenen bor katkılı HAp'nin karakterizasyonu katı-hal NMR (MAS-NMR), Raman spektroskopisi ve FTIR analizleri ile yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda apatit yapısına bor eklendiğinde PO_4^{2-} ve OH^- gruplarının kısmen borat gruplarıyla yer değiştirdiği ve yeni kalsiyum borohidroksiapatit oluştuğu belirlenmiştir. Çalışmada P/B oranı 7.22 olduğunda bor atomlarının apatitik kafes yapısına tamamen katıldığı, bu oran 7.22-11 arasında olduğunda iki fazlı yapının oluştuğu, 7.22'den küçük olduğunda ise üç fazlı bir yapının oluştuğu belirlenmiştir.

Baykal ve ark. [121] bor içeren apatit malzemenin metabolizma üzerinde ve kemik erimesi tedavisinde alternatif bir etkisinin olduğu düşüncesiyle, 3 farklı katı hal yöntemiyle sentez gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen 3 ürünün de X ışını saçınımları ve FTIR spektrumları aynı olmasına rağmen X ışını saçınımlarındaki pik şiddetleri farklı bulunmuştur. Her üç ürününde içerisinde Ca_3B_2O grubunun olduğu, ancak OH^- grubunun karakteristik FTIR pikleri olan 630 cm^{-1} , 3570 ve 3640 cm^{-1} pikleri mevcut olmadığından, ürünlerin tamamının Ca-B-apatit olup, Ca-B-hidroksiapatitin yapıda olmadığı sonucuna varılmıştır.

Gündoğmaz ve Güler [122, 123] yaptıkları çalışmada, bir borat bileşiği olan kolemanit ($2CaO \cdot 3B_2O_3 \cdot 5H_2O$) ve diamonyum fosfat ($(NH_4)_2HPO_4$) bileşiklerinin 1200°C ve 850°C 'de 6 saat ısıtılması ile oluşan katı hal reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin yapılarını incelemişlerdir. Yapılan X-ışınları mineral analizi, Diferansiyal Termal Analiz – Termogravimetrik (DTA-TG) analiz ve SEM-EDX analizleri ile 1200°C 'de oluşan ürünün bor içeren HAp yapısında olduğunu, 850°C 'de oluşan ürünün ise CaB_2O_4 ve BPO_4 yapısında olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra bu çalışmaya ek olarak üretimi, aynı başlangıç maddelerini, aynı yöntemle 700°C 'den 1200°C 'ye kadar değişen sıcaklıklarda 12 saat ısıtarak gerçekleştirmişlerdir. Değerlendirmeler sonucu 700°C 'de BPO_4 , CaB_2O_4 ve $Ca(BPO_5)$ fazlarının, 1000°C 'de $Ca(BPO_5)$ ve $\beta\text{-}Ca_3(PO_4)_2$ fazlarının, 1200°C 'de ise yalnızca kalsiyum borohidroksiapatit yapısının oluştuğunu belirlemişlerdir. Hayakawa ve ark. [124] bor içeren hidroksiapatit sentezini ıslak

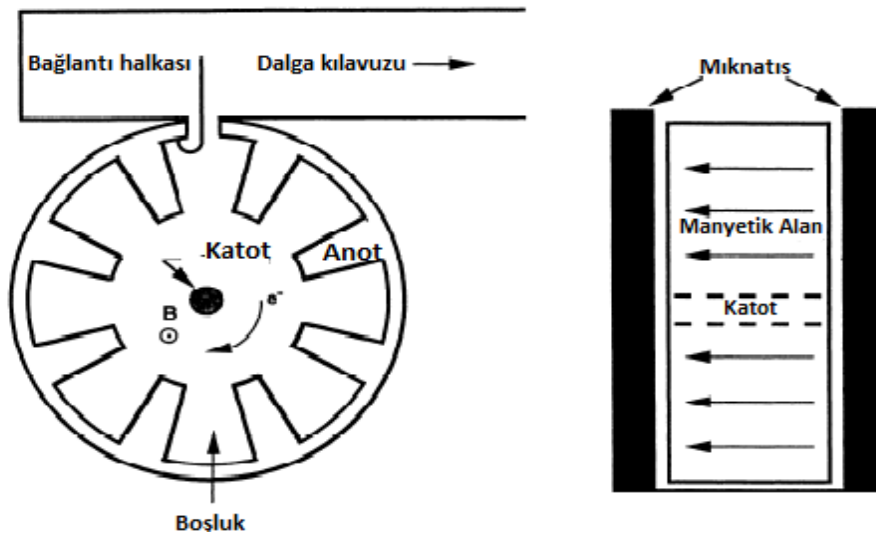
çöktürme yöntemini izleyen 700-1200°C arası değişen sıcaklıklarda ısı uygulamasıyla gerçekleştirmişler ve bor katkısının mikroyapıya olan etkisini değerlendirmişlerdir. Bor ve fosforun etrafındaki yapılar MAS-NMR spektroskopisi ile incelenirken, elde edilen yapının kimyasal bileşimi indüktif eşleşmiş optik emisyon spektroskopisi (ICP), kristal yapısı ise XRD analizleri ile belirlenmiştir. Sonuçlar, 700°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda HAp'nin β -TCP'ye termal olarak bozunması indüklenirken, 900°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda β -TCP oluşumunun yanında HAp ve $B(OH)_3$ arasındaki kimyasal reaksiyonu tetikleyerek bor katkılı HAp partiküllerinin oluşmasına neden olduğunu göstermiştir. β -TCP ise 1200°C'nin üzerinde α -TCP'ye dönüşmektedir. Ağırlıkça % 0.4 bor katkısı yapılan HAp'in Ca/P oranı 1.60 olarak hesaplanmıştır. MAS-NMR sonuçları bor atomlarının HAp kafes yapısına BO_3^{3-} ve BO_4 grupları olarak 900°C'nin üstündeki sıcaklıklarda girdiğini göstermiştir. Barheine ve ark.[125, 126] yüksek sıcaklıkta katı hal reaksiyonu ile sentezlenen bor katkılı hidroksiapatitin yapısındaki değişiklikleri katı-hal NMR spektroskopisi ile incelemişler ve kafes yapısına katılan borat gibi trigonal iyon birimlerinin, iyonun farklı elektrik yükü, geometrik şekli, anyon büyüklüğü gibi özellikleri nedeniyle değişim bölgesinde ciddi bozulmalara neden olduğunu belirtmişlerdir. Oluşan yapının fosfat içeriğinin %30'u kadarının kristalin HAp yapısında, %70'inin ise B-HAp olduğunu iddia etmişler ve "coreshell" modelini önermişlerdir. HAp kafes yapısındaki negatif yüklü PO_4^{3-} ve OH^- bölgelerinde gerçekleşen anyon değişiminin, anyon değişimi gerçekleşen apatit ve proteinler arasındaki kimyasal bağların ve elektrostatik etkileşimlerin kontrolü ve aynı zamanda bu apatitin insan vücudundaki çözünürlüğünün kontrolü için oldukça önemli olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca, bor katkılı hidroksiapatitin büyüme faktörü taşıyan bir doku iskelesi olarak mevcut doku iskelelerine bir alternatif olabileceği fikrini savunmuşlardır. Çalışmalarına kalsiyum karbonat $CaCO_3$, bor oksit B_2O_3 ve kalsiyum pirofosfat $Ca_2P_2O_7$ bileşikleri yardımıyla bor katkılı HAp sentezini gerçekleştirerek devam etmişlerdir. Katı hal NMR analizleri borun hidroksiapatitin yapısına girmesinden kaynaklanan reaksiyonların, kristal HAp çekirdeğini saran $CaO-P_2O_5-B_2O_3-OH$ sisteminde bir BCaP fazı oluşturduğunu göstermiştir. *In vitro* biyobozunma deneyleri B-HAp'in, HAp ve β -TCP'den daha hızlı bozunduğunu, biyoaktivite çalışmaları da B-HAp'in apatit oluşturma yeteneğinin arttığını göstermiştir [127].

Bölüm 2.5.'de çalışma kapsamında yapay vücut sıvısından bor kalsiyum fosfat fazının çöktürülmesi ve kitosan doku iskelelerinin bu apatitik faz ile kaplanmasının sağlanması amacıyla kullanılan mikrodalga enerjisi ile ilgili bilgiler verilmiştir.

2.5. Mikrodalga Enerjisi

Mikrodalga ışınım, tüm diğer elektromanyetik ışınmalarda olduğu gibi, hem elektriksel hem de manyetik olmak üzere iki bileşenden oluşur. Elektromanyetik spektrumun radyo dalgaları ile kızıl ötesi ışınlar arasındaki bölümünde yer alan mikrodalgalar ışık hızında hareket eder. Frekansları 0.3 ile 300 GHz arasında, dalga boyları ise 1 mm ile 1 m arasındadır. X-ışınlarından, UV ışınlarından ve kızıl ötesi ışınlardan daha düşük frekanslardaki bu enerjiden, sadece dönme hareketi yapacak şekilde etkilenen moleküllerin yapısındaki kimyasal bağlar kırılmaz. Mikrodalga ile ısıtmanın sağlanması için endüstriyel, bilimsel ve medikal alanda kullanılmak üzere frekanslar 0.915 ve 2.45 GHz olarak belirlenmiştir. Ayrıca son yıllarda materyal üretimi için kullanılan ve 0.9 ile 18 GHz frekansları arasında çalışabilen mikrodalga fırınlar geliştirilmiştir.

Mikrodalga fırınlar temel olarak 3 bileşenden oluşmaktadır: mikrodalga kaynağı (jeneratör), iletim hattı ve aplikatör. Jeneratörün ürettiği elektromanyetik radyasyon, iletim hattı aracılığıyla aplikatöre ulaştırılır ve böylece malzemenin ısınması sağlanır. Magnetronlar hem ev tipi hem de endüstriyel mikrodalga fırınlarda sıklıkla kullanılan etkili, güvenilir ve ucuz jeneratörlerdir. Şekil 2.6'da magnetrona ait şematik diyagram verilmiştir [128].



Şekil 2.6. Mikrodalga magnetron tüpünün (a) üstten (b) yandan görünüşü [128].

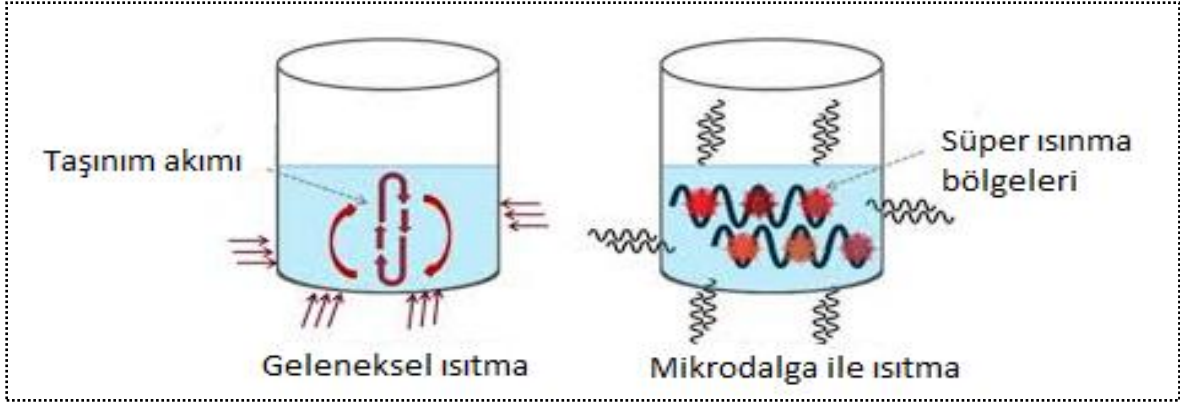
Mikrodalga ile ısıtmada aplikatörlerin tasarımı kritik bir önem taşımaktadır, çünkü malzemenin ısınması doğrudan aplikatör aracılığı ile gerçekleşmektedir. Tasarlanan aplikatörler tekli ya da çoklu tipte olabilmektedir. Her iki sistem de bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle kullanılacağı alana ve yapılacak uygulamaya yönelik mikrodalga seçimi önemlidir [128].

Ev tipi mikrodalga fırınlar su moleküllerinin çok iyi bir soğurucu olduğu 2.45 GHz'lik frekansta çalışır. Bu frekansta çalışan bir fırının içine koyulan ve mikrodalgayı soğuran bir maddenin molekülleri, saniyede 2.5-3 milyar kez titreşerek kinetik enerji kazanır, böylece madde ısınır ve pişer [129]. Mikrodalga fırınlar, geleneksel fırınlardan farklı bir ısıtma prosesi ile bunu gerçekleştirir. Maddeler mikrodalgaya maruz kaldıklarında absorplama, yansıtma veya enerjiyi geçirme eğilimindedirler. Absorblama ile ısınma mekanizması dipol etkileşimler ve iyonik iletim olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Dipol polarizasyonda, malzemede su moleküllerinin sahip olduğu gibi dipol momente sahip moleküllerin dönmesi ve kendini dış elektrik alanla aynı hizaya getirmeye çalışması sonucu ısınma gerçekleşir. Bir çözelti içindeki iyonlar dipol momente sahip değildir ve yüklü parçacıklardır. İyonlar içeren bir çözeltinin ısınması yüksek frekans polarite değişiklikleri karşısında ileri geri hareket eden ve birbiriyle çarpışan iyonlar sayesinde olmaktadır [130]. Genel olarak mikrodalgalar aşağıdaki özelliklere sahiptirler [131]:

- Proses hızı klasik metodlardan daha hızlıdır,
- Kimyasal maddeleri doğrudan ısıtır,
- Karışımlarda seçici ısıtma sağlar,
- Isıtma doğrudan ve merkezdendir, enerjielektromanyetik dalgalarla taşındığından ortamda enerji kaybı meydana gelmez, maddede sıcaklık gradienti minimum olur,
- Mikrodalga sistemleri kolaylıkla otomatize edilebilir, optimum şartlarda geleneksel sistemlere göre enerji ve zaman tasarrufu sağlar ve bunun sonucunda enerji kaybı minimum olur.

Geleneksel ısıtma yöntemleriyle saatler hatta günler alabilen reaksiyonlar mikrodalga radyasyon kullanılarak çok kısa bir sürede gerçekleşebilmektedir. Geleneksel ısıtma işleminde ısıtma kabın yüzeyinden başlar, enerji termal taşınım yoluyla aktarılır. Bu yöntemde ısıtma iki ortam arasındaki sıcaklık farkının yanı sıra tencerenin yapıldığı malzemenin iletkenlik özelliklerine bağlı olduğu için yavaştır

ve etkin değildir. Mikrodalga ile ısıtmada ise enerji kintetik olarak aktarıldığından, süper ısınma bölgeleri meydana gelmektedir. Bu sayede daha hızlı ve homojen bir ısınma sağlanır [131]. Şekil 2.7’de geleneksel ısıtma ile mikrodalga ile ısıtmanın farkı şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Geleneksel ısıtma ve mikrodalga ile ısıtma.

Mikrodalgalar gıda, metalurji, biyomedikal uygulamalar ve kimya gibi birçok alanda yaygın kullanıma sahiptir. Mikrodalgaların seramik ve polimer üretimlerinde kullanımları ise oldukça dikkat çekmektedir. Üretimlerinde yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyan ancak ısı iletim kapasiteleri oldukça düşük olan seramiklerin sinterlenmesi, seramiklerden kimyasalların ve polimerlerin uzaklaştırılması için mikrodalgaların avantajlarından yararlanılmaktadır [128].

Grubumuzda yapılan çalışmalarla, mikrodalga ışımasının doku mühendisliği alanına yönelik çeşitli uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Doku iskelesi fabrikasyon yöntemlerine bir alternatif olarak, gaz köpükleştirme ile mikrodalga ışıma bir araya getirilerek kemik doku mühendisliğinde kullanıma uygun süper gözenekli hidrojeller üretilmiştir [132]. Diğer bir çalışmada ise, mikrodalga gücünün ve uygulama süresinin 10xSBF’den elde edilen hidroksiapatit yapısı üzerine etkisi incelenerek kemik benzeri hidroksiapatit üretiminin gerçekleştiği koşullar belirlenmiş ve kitosan hidrojel doku iskelelerinin hızlı ve etkin bir şekilde HAp ile kaplanması sağlanmıştır [133]. Literatüre ek olarak, mikrodalga etkinliğinin gösterildiği bu çalışmalar ışığında, sunulan tez çalışmasında bor katkılı hidroksiapatitin üretilmesi ve kitosan doku iskelelerinin bu malzemeye kaplanması gerçekleştirilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, farklı miktarlarda borik asit (H_3BO_3) ilave edilerek hazırlanmış olan yapay vücut sıvısından (SBF), mikrodalga yardımıyla bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) sentezi gerçekleştirilmiş ve ardından sentezlenen bu yapının karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında dondurarak-kurutma yöntemiyle hazırlanan kitosan doku iskeleleri birinci aşamada elde edilen bor katkılı hidroksiapatit ile kaplanarak kompozit doku iskeleleri elde edilmiştir. Ayrıca borik asit içermeyen hidroksiapatit de aynı yöntemle üretilmiş ve borun etkisini belirleyebilmek için bütün deneyler karşılaştırmalı olarak yürütülmüştür. Karakterizasyonu tamamlanan doku iskelelerinin osteokondüktif ve osteojenik kapasitelerinin değerlendirilmesi için, MC3T3-E1 fare preosteoblast hücreleri ile kültür çalışmaları yürütülmüş ve *in vitro* kemik doku oluşumuna yönelik sonuçlar elde edilmiştir. Bu bölümde yukarıda belirtilen tüm deneysel çalışmalar hakkında bilgiler verilmiştir.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Kitosan doku iskelesi üretiminde kullanılan %75-85 deasetilasyon derecesine sahip orta molekül ağırlıklı kitosan Sigma-Aldrich (Almanya), kitosanın çözücüsü olan asetik asit ise Riedel de Haen (A.B.D.) firmasından satın alınmıştır. İskelelerin su içeriğinin saptanmasında kullanılan fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.4) Sigma (Almanya) firmasından alınan tabletler ile hazırlanmıştır.

Yapay vücut sıvısı (SBF) hazırlanmasında kullanılan tuzlardan sodyum klorür ($NaCl$), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), magnezyum klorür heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) Merck (Almanya) firmasından, borik asit (H_3BO_3) BDH Chemicals Ltd (İngiltere) firmasından, sodyum hidroksit ($NaOH$) ve sodyum bikarbonat ise ($NaHCO_3$) Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Üretilen hidroksiapatitlerin yıkanması ve doku iskelelerinin stabilizasyonu için kullanılan etanol (%96) Colony Sugar Mills (Pakistan) firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan MC3T3-E1 hücre hattı Riken hücre bankasından (Tsukuba, Japonya) temin edilmiştir. Hücrelerin çoğaltılması ve kültüründe kullanılan Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM) ve fetal sığır serumu (FBS) Lonza (İsviçre) firmasından, Dulbecco fosfat tampon

çözeltisi (DPBS) ve Tripsin/EDTA (%0.01 tripsin/10 mM EDTA) çözeltisi Hyclone (A.B.D) firmasından, penisilin-streptomisin Biological Industries (İsrail), β -gliserol fosfat ve askorbik asit ise Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücre canlılığının takibinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT) Sigma-Aldrich (Almanya), izopropanol Aklar Kimya (Türkiye), HCl (%37) ise Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin fiksasyonunda kullanılan glutraldehit ve SEM analizi için örnek hazırlamada kullanılan hekzametildisilazan, Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin ölçümünde kullanılan Triton X-100 Sigma (Almanya), 2-amino 2-metil-1,3-propanol Aldrich (Almanya), magnezyum klorür heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ve sodyum hidroksit (NaOH) ise Merck (Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Hücrelerden RNA izolasyonunda kullanılan Trizol ise Invitrogen (A.B.D) firmasından satın alınmıştır. Hücre morfolojilerini göstermek amacıyla kullanılan DAPI ve Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge F-aktin antikoru Invitrogen (A.B.D) firmasından alınmıştır.

3.2. Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Hidroksiapatit Üretimi ve Karakterizasyonu

3.2.1. Bor katkılı hidroksiapatit üretimi

Biyomimetik yöntemle hidroksiapatit (HAp) ve bor katkılı hidroksiapatitin (B-HAp) üretilmesi amacıyla Maviş ve ark. [10] tarafından hazırlanan 10xSBF seçilmiştir. 10xSBF insan kan plazmasındaki kalsiyum ve fosfat iyon derişimlerinin 10 katına sahiptir ve böylece Ca/P çekirdeklenmesi daha hızlı gerçekleşmektedir. 10xSBF hazırlanırken Taş ve Bhaduri[9] tarafından hazırlanan kalsiyum fosfat çözeltisi temel alınmış, ancak kaplamanın daha hızlı olması ve istenmeyen kristallerin oluşmasının engellenmesi amacıyla reçetede bazı değişiklikler yapılmıştır. Çizelge 3.1.'de çalışma kapsamında hazırlanan 10xSBF çözelti reçetesi verilmiştir. Sırasıyla ilk beş tuz 800 mL ultra saf su içinde çözülmüş ve daha sonra hacim ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Pyrex balon joje içerisinde hazırlanan bu stok çözelti çöktürme öncesine kadar oda sıcaklığında ya da +4°C'de saklanabilir.

Çizelge 3.1. 10xSBF çözelti reçetesi (Toplam hacim 1 L).

Bileşenler	EklemeSırası	Miktar(g)	Derişim(mM)
NaCl	1	58.443	1000.00
KCl	2	0.373	5.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	3	3.675	25.00
MgCl ₂ .6H ₂ O	4	1.016	5.00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5	0.250	3.62
*NaHCO ₃	6	0.084	10.00

*100 mL SBF için.

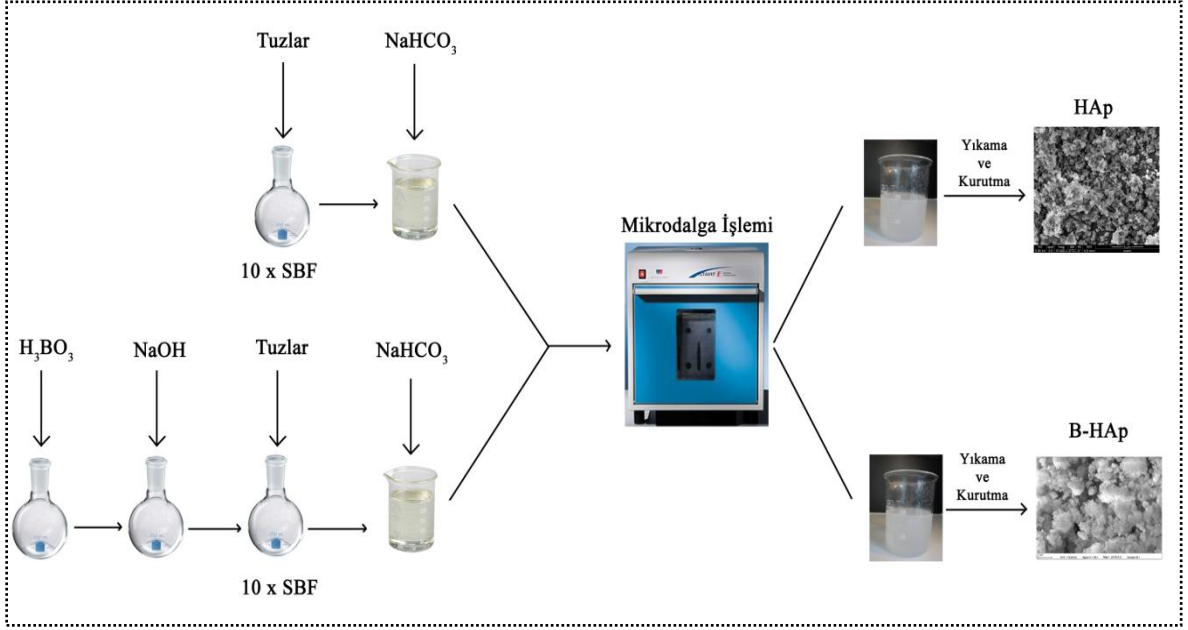
Tez kapsamında yapılan çalışmalarda bor katkısının daha iyi yapılabilmesi amacıyla Çizelge 3.1’de verilen 10xSBF’nin yanısıra Taş ve Bhaduri [9] tarafından hazırlanan SBF ile dedenemeler yapılmıştır. Çizelge 3.2.’de Taş ve Bhaduri-SBF’nin reçetesi verilmiştir. Taş ve Bhaduri-SBF hazırlanırken tuzlar 1900 mL distile su içinde sırasıyla çözülmüş ve daha sonra üzeri distile su ile 2000 mL’ye tamamlanarak stok çözelti hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Taş ve Bhaduri-SBF reçetesi (Toplam hacim 2L).

Bileşenler	EklemeSırası	Miktar(g)	Derişim(mM)
NaCl	1	116.8860	1000.00
KCl	2	0.7456	5.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	3	7.3508	25.00
MgCl ₂ .6H ₂ O	4	2.0330	5.00
NaH ₂ PO ₄	5	2.3996	10.00
*NaHCO ₃	6	0.168	10.00

*200 mL SBF için.

Çöktürme öncesi 10xSBF stok çözültiden 100 mL ve Taş SBF stok çözültiden 200 mL cam beher içine alınarak konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde NaHCO₃ eklenmiştir. SBF içindeki iyonların aktifleştirilmesi için mikrodalga enerjisinden yararlanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan mikrodalga fırın (Milestone, İtalya) çoklu tipte aplikatöre sahip olup, her noktaya eşit mikrodalga uygulaması sağlamaktadır. Yapılan sentez işlemlerinin şematik gösterimi Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. HAp ve B-HAp üretiminin şematik gösterimi.

Tez kapsamında yapay vücut sıvısından çöktürülen kemik benzeri hidroksiapatite bor katkısının sağlanabilmesi için SBF reçetesinde bazı değişiklikler yapılmıştır. Çizelge 3.3'te, uygulanan mikrodalga gücü, süresi ve tekrar sayısı gibi değişkenlerin yanı sıra farklı borik asit ilavelerinin ardından uygun çökeltme pH'ının (6.5-7.4) sağlanabilmesi için ilave edilmesi gerekli NaOH ve NaHCO₃ miktarlarının belirlenebilmesi için yapılan denemelerin koşulları verilmiştir.

Biyomimetik yöntemle hidroksiapatit üretiminde SBF pH'ının çökeltme pH aralığında olması çok önemlidir. Aksi takdirde çökeltme gerçekleşmez. Çalışmalar sırasında borik asit, sodyum bikarbonat ve NaOH miktarları bu dengenin bozulmamasına dikkat edilerek eklenmiş ve her aşamada çözeltinin pH'ı (NeoMet, İSTEK, Kore) ölçülmüştür.

Mikrodalga yardımı ile çökeltme işlemi sonrasında istenmeyen fazların uzaklaştırılması amacıyla örnekler 3 defa etanol ve 2 defa distile su ile her defasında 5 dk 6,000 rpm'de santrifüjlenerek yıkanmış ve 37°C sıcaklıkta kurumaları sağlanmıştır.

Çizelge 3.3. Mikrodalga destekli B-HAp ve HAp üretim koşulları.

Kullanılan H ₃ BO ₃ Miktarı (mg)*	Kullanılan NaOH (10 M) miktarı (µL)	Kullanılan NaHCO ₃ miktarı (g)	Güç (W)	Süre(s)	Tekrar sayısı	Kullanılan SBF
5	-	0.0840*	600	30	9	10xSBF
10	-	0.0840*	600	30	9	10xSBF
10	-	0.0840*	600	30	15	10xSBF
10	-	0.0840*	1200	15	9	10xSBF
10	-	0.0840*	1200	15	15	10xSBF
10	900	0.0840*	600	30	9	10xSBF
10	-	0.1680**	600	30	9	Taş SBF
10	-	0.1680**	600	30	15	Taş SBF
17	-	0.0940*	-	-	-	10xSBF
17	-	0.1040*	600	30	9	10xSBF
17	-	0.0840*	-	-	-	10xSBF
-	-	0.0840*	600	30	9	10xSBF
-	-	0.0840*	600	30	15	10xSBF
-	-	0.1680**	600	30	9	Taş SBF
-	-	0.1680**	600	30	15	Taş SBF

*100 mL SBF için. **200mL SBF için.

3.2.2. Bor katkılı hidroksiapatitin karakterizasyonu

3.2.2.1. Endüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) analizi

Üretilen B-HAp'nin yapısındaki Ca, P, B ve HAp'nin yapısındaki Ca, P oranları ICP-OES (Perkin Elmer Optima 4300DV) analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca ICP-OES sonuçlarından elde edilen ağırlıkça % bor miktarlarından, her bir doku iskelesindeki hidroksiapatit kaplamalardaki, dolayısıyla doku iskelelerindeki ortalama bor miktarları hesaplanmıştır.

3.2.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDX) analizi

Üretilen toz şeklindeki B-HAp ve HAp yapılarının morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla SEM (FEI, Nova Nanosem 430) görüntüleri alınmıştır. İletkenlik kazandırmak amacıyla örnekler görüntüleme öncesi altın-paladyum tabakası ile kaplanmıştır. Yığın halindeki HAp ve B-HAp'nin Ca/P oranı ise örnekler karbon kaplandıktan sonra aynı cihazda (XFlash 3001 SDD-EDS dedektörü kullanılarak) yapılan EDX analizi ile belirlenmiştir.

3.2.2.3. Elementel analiz

Üretilen B-HAp ve HAp'nin yapısına katılmış olankarbonat (CO_3^{-2}) miktarının belirlenmesi için elementel analiz cihazı (LECO, CHNS-932) kullanılmıştır. Yapı içerisinde bulunan C miktarının belirlenmesinin ardından C ile CO_3^{-2} arasındaki stokiyometrik ilişki kullanılarak, B-HAp ve HAp yapılarındaki karbonat miktarı hesaplanmıştır.

3.2.2.4. Raman spektroskopisi

Üretilen B-HAp ve HAp'nin molekül yapısı titreşimsel spektroskopinin bir türü olan Raman spektroskopisi analizi ile belirlenmiştir. Yapıdaki PO_4^{-3} ve OH^- gruplarının varlığı 1064 nm Nd-YAG lazere sahip Bruker FRA 106/S RAMANSCOPE II cihazı ile 532 nm'de gerçekleştirilen analizlerle gösterilmiştir.

3.2.2.5. X ışını kırınımı (XRD) analizi

B-HAp ve HAp yapılarının faz özelliklerini incelemek ve karşılaştırma yapmak amacıyla XRD (PANanalytical X'Pert Pro MPD, 45 kv-40 mA Cu source) cihazı kullanılmıştır. Örnekler için $20-80^\circ$ (2θ) arasında, 0.026° 'lik adımlarla (adım başına 99.45 s süre) tarama yapılarak sonuçlar elde edilmiştir.

3.2.2.6. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

B-HAp ve HAp örneklerinin kimyasal yapıları ve yapıda bulunan OH^- , CO_3^{-2} ve PO_4^{-3} fonksiyonel grupların varlıkları $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında alınan ATR-FTIR (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) spektrumları ile gösterilmiştir.

3.2.2.7. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Üretilen B-HAp ve HAp'nin mikroyapısal karakterizasyonu ve kristal yapıları TEM (FEI, Tecnai G2 F30) görüntüleri ile belirlenmiştir.

3.2.2.8. Üretim verimi

Farklı koşullarda üretilen B-HAp ve HAp örneklerin her biri için, 100 mL SBF'den çöktürme ile elde edilen miktarlar yıkama ve kurutma işlemlerinden sonra elektronik hassas terazi (Precisa 205 A SCS; ± 0.0001 duyarlılık, İsviçre) ile tartılmış ve üretim verimleri belirlenmiştir.

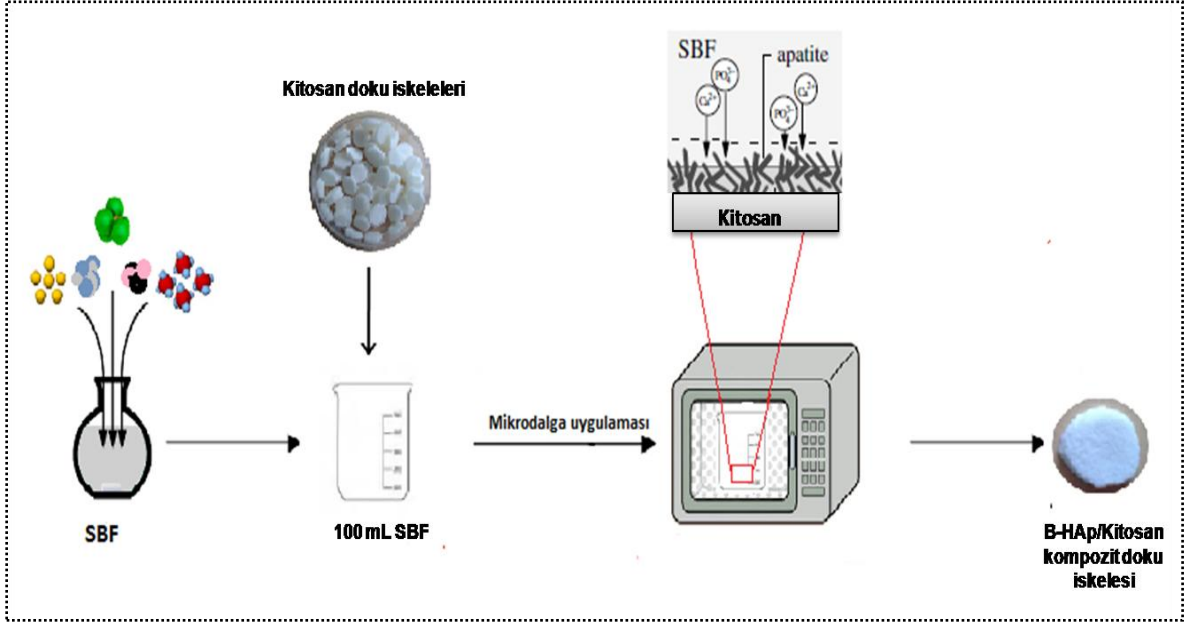
3.3. Kompozit Doku İskelelerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

Dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanan kitosan doku iskeleleri [134] üzerine bor katkılı hidroksiapatit kaplama yapılmış ve karşılaştırma yapmak amacıyla aynı koşullarda hidroksiapatit kaplama da yapılarak iki tür kompozit iskele elde edilmiştir. Çalışmada 3 farklı doku iskelesi hazırlanmıştır. Bunlar i) kitosan ii) HAp/kitosan ve iii) B-HAp/kitosan olup aşağıda üretimleri hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir.

3.3.1. Kitosan, B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan doku iskelelerinin üretimi

Öncelikle 0.2 M asetik asit içeren distile su kullanılarak %2'lik (w/v) kitosan (%75-85 deasetilasyon derecesi, Sigma-Aldrich) çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti, safsızlıklarından arındırılmak üzere filtreden geçirilmiş ve 24-gözlü Petri kaplarına (İsviçre) dökülerek -20°C'de dondurulmuştur. Bu aşamadan sonra kitosan doku iskeleleri, liyofilizatör (Christ, Almanya) kullanılarak -80°C'de "dondurarak-kurutma" işlemine tabi tutulmuştur. Bu yöntemde iskeleler içerisindeki buz kristalleri liyofilize edildiğinden, içsel bağlantılara sahip gözenekli bir yapı elde edilmiştir. Elde edilen kitosan doku iskelelerinin stabilizasyonu için iskeleler, %96'lık (v/v) etanol çözeltisi içerisinde 1 gün, %70'lik (v/v) etanol çözeltisi içerisinde ise 1 saat bekletilmiştir.

Hidroksiapatit içeren kompozit doku iskelelerinin hazırlanması için ise 10xSBF ve bor katkılı 10xSBF (B-SBF) hazırlanmış ve kitosan doku iskelelerinin kaplanması mikrodalga yardımıyla sağlanmıştır. İlk olarak çöktürme öncesi iskeleler 2 mm x 9 mm boyutlarında kesilmiş ve seçilen SBF'nin stok çözeltisi içerisinde vakum etüvünde (Thermo Scientific, Lindberg Blue, ABD) çöktürülmüştür. Daha sonra kaplamalar NaHCO₃ ilave edilmiş 100 mL SBF içerisinde 7 iskele/100 mL SBF olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'de dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan kitosan doku iskelelerinin mikrodalga yardımıyla B-HAp ve HAp ile kaplama işlemi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Doku iskelelerinin mikrodalga fırında B-HAp ve HAp ile kaplama işlemlerinin şematik gösterimi.

B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan doku iskelelerinin kaplanması için uygun koşullar B-HAp ve HAp fazlarının karakterizasyonu sonrasında belirlenmiştir. Kaplama için belirlenen koşullar Bölüm 4.1’de detaylı olarak açıklanacaktır. Hazırlanan iki tür SBF ile yapılan kaplamada da aynı koşullarda mikrodalga uygulaması yapılmıştır. İstenilen özellikte hidroksiapatit kaplama yapılabilmesi için en uygun değerler 600 W ve 30sx9 tekrar olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda yapılan kaplamaların SEM analizi sonuçları değerlendirildiğinde, bir defa kaplama yapıldığında kitosan yüzeyinde hidroksiapatit çekirdekleri olduğu, ancak yeterli bir kaplamanın olmadığı görülmüştür. Bu nedenle karakterizasyon çalışmalarına 4 defa kaplama yapılan örnekler üzerinden devam edilmiştir. Her bir kaplama sonrasında istenmeyen fazlar 2 dk distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve tekrar SBF ortamına alınarak diğer kaplamaya geçilmiştir. Son kaplamanın ardından 30 dk distile su, 30 dk etanol ve tekrar 30 dk distile su ile yıkama yapılarak tüm doku iskeleleri -20°C’de dondurulmuş ve liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.3.2. B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan kompozit doku iskelelerinin karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında üretilen kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelelerinin kimyasal ve fiziksel analizleri aşağıdaki yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

Kitosan ve HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelelerinde kitosana ait amid 1 ve 2 ile hidroksiapatite ait OH⁻, CO₃⁻² ve PO₄⁻³ fonksiyonel grupların varlıkları 400–4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ATR-FTIR (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) ile gösterilmiştir.

3.3.2.2. X ışını kırınımı (XRD) analizi

Kitosan ve HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelelerinin yarı kristalin yapıya sahip kitosan ve kemik benzeri HAp yapıları XRD (PANanalytical X'Pert Pro MPD, 45 kv-40 mA Cu source) ile incelenmiştir. Sonuçlar 5-80° (2θ) arasında, 0.039°'lik adımlarla (adım başına 46.41 s süre) tarama yapılarak elde edilmiştir.

3.3.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDX) analizi

Hazırlanan doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri (Zeiss Evo-50, Almanya) taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Örnekler altın-paladyum ile kaplandıktan sonra incelemeye alınmıştır. Kompozit iskelelerdeki HAp ve B-HAp kaplamanın Ca/P oranı ise örnekler karbon kaplandıktan sonra aynı cihazda (XFlash 3001 SDD-EDS dedektörü kullanılarak) yapılan EDX analizi ile belirlenmiştir.

3.3.2.4. Şişme deneyleri

Üretilen doku iskelelerinin şişme oranlarını belirlemek amacıyla örnekler 37°C'de fosfat tampon çözeltisine (PBS, pH=7.4) konulmuştur. Daha sonra şişmesi tamamlanan örnekler PBS içerisinden alınarak üzerlerindeki fazla çözelti süzgeç kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. Şişme oranları gravimetrik olarak Eşitlik 3.1 kullanılarak kuru temelde belirlenmiştir:

$$\text{Şişme oranı} = (W - W_0)/W_0 \quad (3.1)$$

Eşitlikteki W₀ kitosan iskelenin kuru ağırlığını, W ise yaş ağırlığını göstermektedir.

3.3.2.5. Gözenekliliğin belirlenmesi

Hazırlanan kitosan doku iskelelerinin % gözenekliliği gravimetrik olarak belirlenmiş [135] ve Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Gözeneklilik (\%)} = 1 - [\rho_{\text{doku iskelesi}}/\rho_{\text{gerçek}}] \times 100 \quad (3.2)$$

Verilen eşitlikte $\rho_{\text{doku iskelesi}}$, doku iskelesinin ağırlığının hacmine bölünmesi ile elde edilen yoğunluğunu, $\rho_{\text{gerçek}}(0.50\text{g/cm}^3)$ ise doku iskelesinin yapıldığı malzemenin yoğunluğunu göstermektedir.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. L929 fibroblast hücre hattı ile yapılan sitotoksisite çalışmaları

Farklı bor konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla sitotoksisite testi ISO 10993/EN 30993 standartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir[136]. İlk aşamada ikilenme süresi (t_d) 32 sa, özgül üreme hızı 0.022 sa^{-1} olan ve HÜKÜK hücre bankasından alınan L929 fare fibroblast hücreleri MTT analizi için 24-gözlü kültür kaplarına, morfolojik gözlem için ise 6-gözlü kültür kaplarına, 1×10^5 hücre/mL konsantrasyonda ekilmiştir. Hücreler %10 FBS ve %1 penisilin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ortamında 24 sa inkübe edildikten sonra, belirlenen miktarlardaki bor çözeltisi kültür kaplarına eklenmiştir. Bu amaçla otoklavlanmış saf su içerisinde borik asit çözeltisi hazırlanmış ve NaOH kullanılarak pH 7.4'e ayarlanmıştır. Daha sonra hazırlanan çözelti $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek sterillemiştir. Gerekli seyreltmeler yapılarak hücreler farklı konsantrasyonlardaki (9-300 $\mu\text{g/mL}$) bor çözeltisi ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığı 3 gün boyunca MTT analizi ile takip edilmiştir.

MTT analizinin yanında, hücreler morfolojik gözlem amacıyla kristal viyole ile boyanmıştır. Bu amaçla öncelikle kültür kabında bulunan besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1:1 (v/v) oranında aseton/metanol karışımı ile, 4°C 'de 20 dk fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyon işleminden sonra %20'lik metanol çözeltisinde hazırlanan %0.5'lik kristal viyole çözeltisi hücrelerin üzerine konulmuş ve 30 dk bekletilmiştir. Son olarak boyanan yüzeyler akan suyun altında yıkanmış ve mikroskop altında morfolojik gözlem gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Hücrelerin doku iskelelerine ekilmesi

Karakterizasyonları tamamlanan doku iskelelerinin kemik doku mühendisliğindeki kullanım potansiyellerini araştırmak amacıyla hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yapılan *in vitro* çalışmalarda MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı kullanılmıştır. MC3T3-E1 preosteoblastik hücreler yüzeye bağımlı hücreler olup fare kafatasından elde edilmiştir. Hücreler önce

flasklarda çoğaltılmış, kültür ortamı olarak %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM besi ortamı kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında 15. pasajdaki hücreler kullanılmış ve kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan olmak üzere 3 farklı grup oluşturulmuştur. Öncelikle 24-gözlü polistiren hücre kültür kaplarının (TCPS, Orange Scientific, Belçika) yüzeyi Parafilm ile kaplanmıştır. Böylece TCPS yüzeyler hidrofobik hale getirilerek, hücrelerin doku iskelesinden kültür kabının yüzeyine göç etmeleri engellenmiştir. Parafilmier öncelikle %70'lik etanolde bekletilmiş, daha sonra 24-gözlü kültür kaplarına yerleştirilmiş ve 30 dkUV'ye maruz bırakılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Etanolun ortamdaki uzaklaşmasını sağlamak için üç defa steril PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra doku iskeleleri %70'lik etanol içerisinde vakum etüvünde çöktürülmüş ve 2 sa sonunda kültür kaplarına yerleştirilerek 45 dkUV'ye maruz bırakılmış ve böylece sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Doku iskeleleri, yapıdaki etanolü uzaklaştırmak amacıyla steril PBS ile yıkanmış ve %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamı içerisine alınmıştır. Doku iskelelerinin serum proteinleri ile etkileşmeleri için 24 sa beklenmiş ve hücre ekimine geçilmiştir. Hücreler, 30 μ L besi ortamı içerisinde, 1×10^5 hücre/mL hücre yoğunluğu olacak şekilde doku iskelelerine ekilmiştir. Kültüre edilen hücreler, %95 nem ve %5CO₂ içeren inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) tutulmuştur. Hücre ekiminden 24 sasonra doku iskelelerinin üzerinde bulunan ortam çekilmiş ve yerine 10 mM β -gliserol fosfat ve 50 μ g/mL askorbik asit içeren osteojenik farklılaşma ortamı konulmuştur. Kültür süresi boyunca hücrelerin içerisinde bulunduğu ortam 2-3 günde bir yarı yarıya değiştirilerek tazelenmiştir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabininde (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. MTT analizi

Doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı ve mitokondriyal aktiviteleri MTT tuzunun mitokondriyal enzimler tarafından formazan kristallerine indirilmesi prensibine dayanan analiz ile belirlenmiştir. Sarı renkli MTT çözeltisi hücre mitokondrisinde, mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Buna bağlı olarak oluşan formazan kristallerinin yoğunluğu, ortamda bulunan hücrelerin canlılığı ve hücresel aktivitesi hakkında bilgi vermektedir.

Bu amaçla kültürün 1, 3, 5, 7, 9, 14 ve 21. günlerinde doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Daha sonra 37°C'de 3 sa boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiş ve doku iskeleleri üzerindeki ortam tekrar çekilerek her bir göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Böylece formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmış ve elde edilen çözülden 200 µL alınarak, 96-gözlü kültür kaplarında, 570 nm'de spektrofotometrik (Asys UVM 340, Avusturya) olarak ölçüm yapılmış ve çözeltilerin optik yoğunlukları belirlenmiştir.

3.4.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Hücrelerin doku iskelelerindeki morfolojilerini ve hücre-doku iskelesi, hücre-hücre etkileşimlerini belirlemek için, kültürün 4., 7. ve 14. günlerinde, SEM (ZeissEvo 50, Almanya) görüntüleri alınmıştır. Örneklerin hazırlanması için öncelikle doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve iskeleler iki kez PBS (pH=7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra doku iskeleleri % 2.5'lük (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile 30 dk boyunca muamele edilmiş ve böylece hücrelerin fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler analize kadar PBS içerisinde 4°C'de saklanmıştır. SEM analizinden önce, doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve iskeleler sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (v/v) etanol çözeltilerinde 2'şer dk bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İskeleler daha sonra heksametildisilazan (HMDS) içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Oda sıcaklığında kurutulan örnekler, altın-paladyum ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

3.4.5. İmmunohistokimyasal boyama

Belirlenen hücre kültür süreleri sonunda kültür ortamından alınan doku iskeleleri iki kez PBS ile yıkandıktan sonra %4 paraformaldehit (Sigma-Aldrich) içerisinde 1 saat fikse edilmiştir. Fiksasyon sonunda örnekler %30'luk sukroz çözeltisi içerisine alınarak 1 gece +4°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün sukroz çözeltisinden çıkartılan örnekler kryostatta kesilebilmesi için dondurma ortamı (Leica, Almanya) ile kaplanarak sıvı azot içerisinde 5 dk boyunca dondurulmuştur. Sıvı azot içerisinden çıkarılan örnekler -80°C'ye kaldırılmıştır. Daha önceden -20°C'ye getirilmiş kryostat (-20°C, Leica cryostat, CM3050S) ile 5-8 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Boyama yapıncaya kadar kesitler -80°C'de saklanmıştır.

Hücre iskeletinin incelenmesi amacıyla aktin filamentleri immünfloresan olarak işaretlenmiştir. -80°C'den çıkarılan örnekler oda sıcaklığında 15 dk boyunca kurumaları için bırakılmıştır. Kesit kenarları sıvı tutucu özellikteki PapPen (Daido Sangyo Co.Ltd, Japonya)kalem ile sınırlandırılarak örnekler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra % 0.1 Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 10 dk muamele sonucunda hücre membran geçirgenliği arttırılmıştır. Ardından hücreler %1 sığır serum albümin içeren PBS (PBS/A) çözeltisi içerisinde hazırlanmış AlexaFluor 488 phalloidin konjuge F-aktin antikorunu %1'lik (v/v) ve 1/1000 oranında DAPI ile 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İşlemi takiben 3 kez PBS/A ile yıkama yapılmıştır ve floresan mikroskobu (Olympus IX71, A.B.D) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.4.6. RT-PCR analizleri

Hücrelerin osteojenik farklılaşmasını gen ekspresyonu düzeyinde belirlemek için RunX2, ALP, KOL-I, osteokalsin ve osteopontin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlenmiştir.

Kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde doku iskeleleri -80°C'ye kaldırılmıştır. RNA izolasyonu gerçekleştirileceği zaman örnekler Eppendorf tüpüne alınmış, her bir örneğin üzerine 1000 µL Trizol eklenerek 25-30 s vortekslenmiş ve örnekler 2 sa 4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerlerine 200 µL kloroform eklenmiş, çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında, örnekler 4°C'de 10 dk 12,000 g'de santrifüjlenmiş ve sıvı faz yeni bir Eppendorf tüpe aktarılmıştır. Kloroform basamağı proteinden ve fenolden kaynaklanan kirliliği önlemek amacıyla 2 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra sıvı faza 400 µL izopropanol eklenmiş ve hafifçe vortekslenildikten sonra 45 dk -20°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, örnekler 4°C'de 10 dk boyunca 12,000 g'de santrifüjlenmiş, süpernatant atılmış ve pellet 1 mL %75'lik etanol ile yıkanmış ve hafifçe vortekslenmiştir. Örnekler tekrar 4°C'de 5 dk boyunca 7,500 g'de santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmış ve pelletler havada kurutulmuştur. Her bir pelletin üzerine 30-35 µL RNase-free su eklenmiş ve 55-60°C su banyosunda 15 dk bekletilmiştir. Son olarak örnekler analiz yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

RT-PCR analizi, Applied Biosystems Kit cDNA (ABD), SolisBioDyne 5 Hot FirePol® EvaGreen®qPCRMix Plus (Estonya) kitleri ile LightCycler®NanoInstrument (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır. cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 40°C'de 120 dk'da gerçekleştirilmiştir. Ardından, PCR analizi, aktivasyon basamağı 95°C'de 15 dk'da, uzatma basamağı 95°C'de 15 s, 60°C'de 20s, 72°C'de 20 s ve ayrılma basamağı 60°C'de 4s ve 95°C'de 20 s olmak üzere 45 döngüde gerçekleştirilmiştir.

“Housekeeping gen” olarak kullanılan β -aktin, Run X2, KOL-I, osteokalsin ve osteopontin genlerinin primer dizileri (Motek, Türkiye) Çizelge 3.4'te verilmiştir. Yapılan analizin sonuçları bağıl gen ekspresyonu olarak verilmiştir. Tüm veriler $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metoduna [137] göre hesaplanmış, kitosan doku iskelesi üzerindeki hücrelerin ilgili gen ekspresyon seviyeleri temel alınarak, diğer gruplarda (HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan) bunun katları şeklinde değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.

β -aktin	Forward primer 5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3' Reverse primer 5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'
KOL-I	Forward primer 5'-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3' Reverse primer 5'-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3'
Osteokalsin	Forward primer 5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG -3' Reverse primer 5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3'
Run X2	Forward primer 5'-GCATGGCCAAGAAGACATCC -3' Reverse primer 5'-CCTCGGGTTTCCACGTCTC -3'
Osteopontin	Forward primer 5'-CACTTTCACTCCAATCGTCCCTAC-3' Reverse primer 5'-ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC-3'

3.5.İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları istatistiksel açıdan GraphPad Software Instant programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler üç deney için ortalama \pm standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuş ve ortaya çıkan bulgular üzerine tartışmalar yapılmıştır. Öncelikle, bor katkısı yapılan yapay vücut sıvısından mikrodalga yardımıyla kemik dolgu malzemesi ya da sert doku implantlarına alternatif bir yüzey kaplaması olabilecek özellikteki bor katkılı hidroksiapatitin (B-HAp) sentezine ve yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiştir. İkinci bölümde, kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere kitosan doku iskelelerinin ve mikrodalga yardımıyla HAp/Kitosan ve B-HAp/Kitosan kompozit doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu için yapılan çalışmaların sonuçları sunulmuştur. Ardından, MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı ile durgun koşullarda *in vitro* ortamda yürütülen hücre kültürü çalışmalarının sonuçlarına değinilmiştir.

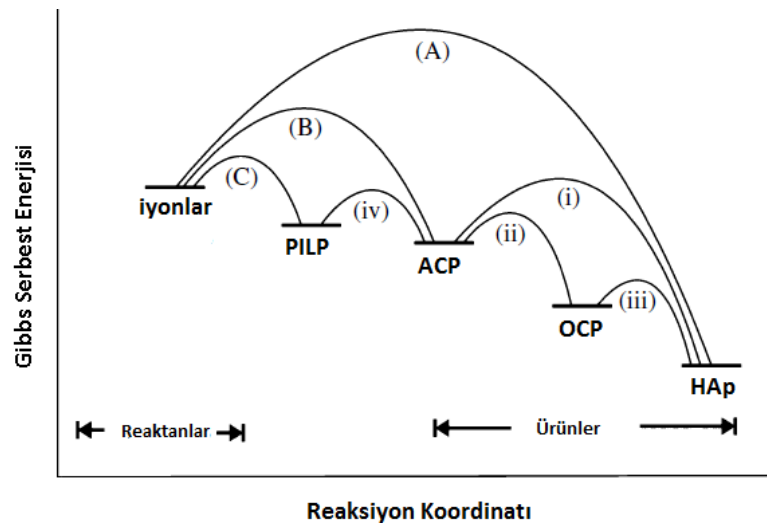
4.1. Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Hidroksiapatit Üretimi ve Karakterizasyonu

4.1.1. Bor katkılı hidroksiapatit üretimi

Yapılan çalışmalar borun osteoindüktif etkilere sahip olduğunu ve hücrelerin ostejenik farklılaşmasını desteklediğini göstermiştir. Kemikler üzerindeki etkisinin moleküler mekanizması henüz açıklanmamış olmasına karşın, borun hücre dışı matris mineralizasyonundan sorumlu kalsiyum birikimini arttırdığı düşünülmektedir[138]. Son yıllarda yapılan çalışmalarla kemik metabolizmasında rol oynadığı gösterilen borun, osteokondüktif özelliğe sahip hidroksiapatitin yapısına katılarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasına karar verilmiştir. Bor katkılı hidroksiapatitler birçok araştırmacı tarafından kimyasal yöntemlerle sentezlenmiş ancak hücrelerle etkileşiminin belirlendiği bir çalışma yapılmamıştır [120, 139]. Nakamura ve ark. [140] ultrasonik sprey piroliz yöntemi ile sentezledikleri bor katkılı hidroksiapatitin kanser tedavisinde kullanılabilecek bir biyomalzeme olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında bu çalışmalardan farklı olarak bor katkılı hidroksiapatitin üretilmesinde, biyomimetik yöntem olan SBF'den çöktürme yöntemi seçilmiştir. Biyomimetik yöntemin avantajları şöyle sıralanabilir: (i) ısı işlem gerektirmediği için polimerler de dahil sıcaklığa duyarlı yüzeylerin kaplanmasında kullanılabilir,(ii) yüksek biyoaktiviteye sahip kemik benzeri apatit yapısı oluşturur,(iii) gözenekli ya da farklı geometriye sahip yapıların

kaplanması için de uygundur ve (iv) üretim sırasında hidroksiapatit yapısının kemik büyüme faktörleri de katılabilir [83].

Bu çalışmada, literatürde belirtilen diğer SBF çözeltileri ile karşılaştırıldığında, yüksek doygunluk derecesine sahip 10xSBF, Tris ve HEPES gibi tamponların kullanılmasına da ihtiyaç duyulmaması gibi avantajları nedeniyle tercih edilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda doygunluk derecesine bağlı olarak 10xSBF ile kısa sürede gerçekleşen çökeltme işlemi, mikrodalga iyonik çözeltilere olan etkisinden de yararlanılarak saatler mertebesinde dakikalara kadar düşürülmüştür. Grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarla HAp sentezi için uygulanacak mikrodalga koşulları belirlenmiştir [133]. Dışarıdan verilen enerji sayesinde, 10xSBF'de bulunan iyonlar daha düşük enerjili, yani termodinamik olarak daha kararlı olan faza dönüşerek doğrudan hidroksiapatiti oluşturmuşlardır. Şekil 4.1'de sistemin izleyebileceği olası yolları gösteren grafiğe yer verilmiştir. SBF çözeltileri gibi, pek çok kristal fazın oluşabileceği süper doygun bir çözelti varsa oluşacak ilk faz termodinamik açıdan en az kararlı ve en çok çözünendir. Bu faz daha sonra sistemin serbest enerjisini azaltmak için daha kararlı bir faza dönüşür (B-ii-iii). Bazen de tek bir öncülden sonra en kararlı yapıyı oluşturur (B-i). İzlenecek yol sistemin aşabileceği toplam enerjiye bağlıdır. Çözelti içerisinde iyonlardan doğrudan HAp oluşumunu sağlayabilecek enerji varsa Ca/P çözeltisinden doğrudan kristalizasyon (A) gerçekleşir. Bunun için yeterli enerji yoksa ilk başta amorf Ca/P (ACP), oluşur sonra ya doğrudan kristalizasyonla ya da önce oktakalsiyum fosfat (OCP) oluşumu gerçekleşerek HAp oluşur [141].



Şekil 4.1. Sistemin Gibbs serbest enerjisini düşürmek için izlenen kristalizasyon yolları [141].

Yapılan çalışmalarda 10xSBF çözeltisine bor katkısı yapıldığında 37°C'de 24 saatte verimsiz bir çökme gözlenmiş ve oda sıcaklığında bekletildiğinde ise herhangi bir çökme gözlenmemişken, mikrodalga desteği ile etkin ve hızlı bir çökmenin sağlandığı belirlenmiştir. Yeterli bor katkısının yapılması amacıyla SBF'ye iyon dengesini etkilemeyecek miktarlarda borik asit ilavesi yapılmış (10mg/mL) ve çökme için gerekli pH değerleri (6.5-7.4) sağlandıktan sonra, mikrodalgaya maruz bırakılarak istenilen yapıda hidroksiapatitin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen hidroksiapatitin bor katkısı ve kalsiyum fosfor oranları ICP-OES analizleri ile belirlenmiş ve Bölüm 4.1.2.1.'de detaylı olarak açıklanmıştır. Üretilen bor katkılı hidroksiapatitin yapısındaki değişiklikleri daha iyi analiz edebilmek amacıyla tüm deneyler bor katkısı yapılmayan hidroksiapatit ile karşılaştırmalı olarak yürütülmüş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

4.1.2. Bor katkılı hidroksiapatitin karakterizasyonu

4.1.2.1. Endüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) analizi

Kemik dolgu maddesi olarak kullanılan seramik biyomalzemelerde Ca/P oranları, malzemenin faz yapısı, homojenliği ve çözünürlüğü hakkında bilgi verdiğinden oldukça önemlidir. Doğal kemiğin ağırlıkça %34.8'i Ca iyonundan, %15.2'si ise P iyonundan oluşmaktadır ve Ca/P molar oranı yaklaşık 1.71 civarındadır. Stokiyometrik hidroksiapatit ise %39.6 Ca, %18.5 P iyonu içerir ve Ca/P oranı yaklaşık 1.67'dir[137].

Biyolojik hidroksiapatitler yapılarına katılan karbonat grupları ya da diğer katyonik veya iyonik gruplarla yer değiştirme reaksiyonlarına girerek stokiyometrik yapıdan sapma gösterirler. Kendiliğinden oluşan bu hidroksiapatitlerin Ca/P oranları 1.67'den daha düşük olmaktadır [20]. Ayrıca, birçok araştırma biyolojik hidroksiapatitin ve stokiyometrik olmayan sentetik hidroksiapatitin biyoyumluluğunun stokiyometrik hidroksiapatitten daha yüksek olduğunu göstermiştir [92, 142, 143].

Çizelge 4.1'de çalışma kapsamında üretilen B-HAp ve HAp örneklerinin yapısında bulunan %Ca, %P, %B ve bunların oranlarına ait ICP-OES analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında üretilen B-HAp ve HAp örneklerinde bulunan %Ca, %P, %B, Ca/P, Ca/P+B ve P/B oranları.

Kullanılan H ₃ BO ₃ miktarı (mg)*	Kullanılan NaOH (10 M) miktarı (µL)***	Kullanılan NaHCO ₃ miktarı (g)	pH	Mikrodalga koşulları		Kullanılan SBF	Ca(%) (w/w)	P(%) (w/w)	B(%) (w/w)	Ca/P #	Ca/P+B#	P/B#
				Güç (W)	Uygulama tekrarsüre							
5	-	0.0840*	6.40±0.03	600	9x30s	10xSBF	30.45±0.64	14.90±0.00	0.47±0.13	1.58	1.45	11.61
10	-	0.0840*	6.21±0.02	600	9x30s	10xSBF	31.64±2.90	16.65±1.70	0.37±0.16	1.47	1.38	19.79
10	-	0.0840*	-	600	15x30s	10xSBF	32.68±1.59	16.43±1.37	0.39±0.09	1.54	1.44	15.20
10	-	0.0840*	-	1200	9x15s	10xSBF	30.80±0.28	15.25±0.07	0.22±0.08	1.57	1.50	26.47
10	-	0.0840*	-	1200	15x15s	10xSBF	31.10±0.57	15.45±0.21	0.25±0.09	1.56	1.49	22.61
10	900	0.0840*	7.02±0.03	600	9x30s	10xSBF	28.10±0.28	15.55±0.35	1.15±0.11	1.40	1.16	4.75
10	-	0.1680**	-	600	9x30s	Taş SBF	33.70±0.10	19.80±0.14	0.04±0.00	1.32	1.31	189.37
10	-	0.1680**	-	600	15x30s	Taş SBF	34.40±0.00	20.05±0.07	0.04±0.00	1.33	1.32	157.28
17	-	0.0940*	6.01±0.02	-	-	10xSBF	-	-	-	-	-	-
17	-	0.1040*	6.05±0.05	600	9x30s	10xSBF	25.80±1.27	13.80±0.14	0.181±0.04	1.44	1.39	27.40
17	-	0.0840*	5.92±0.02	-	-	10xSBF	-	-	-	-	-	-
-	-	0.0840*	-	600	9x30s	10xSBF	34.40±0.28	16.55±0.07	-	1.61	-	-
-	-	0.0840*	-	600	15x30s	10xSBF	34.40±0.21	15.75±0.07	-	1.70	-	-
-	-	0.1680**	-	600	9x30s	Taş SBF	33.70±0.07	19.50±0.14	-	1.32	-	-
-	-	0.1680*	-	600	15x30s	Taş SBF	34.15±0.35	20.05±0.49	-	1.32	-	-

*100mL SBF için **200 mL SBF için ***1 L SBF için.

#Ca/P, Ca/P+B ve P/B oranları molce oranları ifade etmektedir.

Bor katkılı hidroksiapatit üretimi için seçilen koşullar ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de belirtilmiştir. Kontrol grubu olarak da aynı koşullarda bor katkısı yapılmayan HAp seçilmiş ve analizler karşılaştırmalı olarak yürütülmüştür. Çalışma kapsamında hidroksiapatite bor katkısını sağlayan borik asit SBF'ye eklendiğinde ortam pH'ını düşürmüştür. Bu nedenle öncelikle uygun borik asit miktarı belirlenmiş, daha sonra karbonat miktarının değiştirilmesiyle pH dengesi sağlanmaya çalışılmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda pH dengesi sağlanamadığında mikrodalga uygulaması dışında çökelmenin gözlenmediği ve mikrodalga desteğiyle çökme olduğunda ise hidroksiapatite istenilen miktarda bor katkısının yapılamadığı belirlenmiştir. Böylece ultra saf suya borik asit ilavesinin ardından NaOH ile pH ayarlanmış ve daha sonra tuzlar ilave edilmiştir.

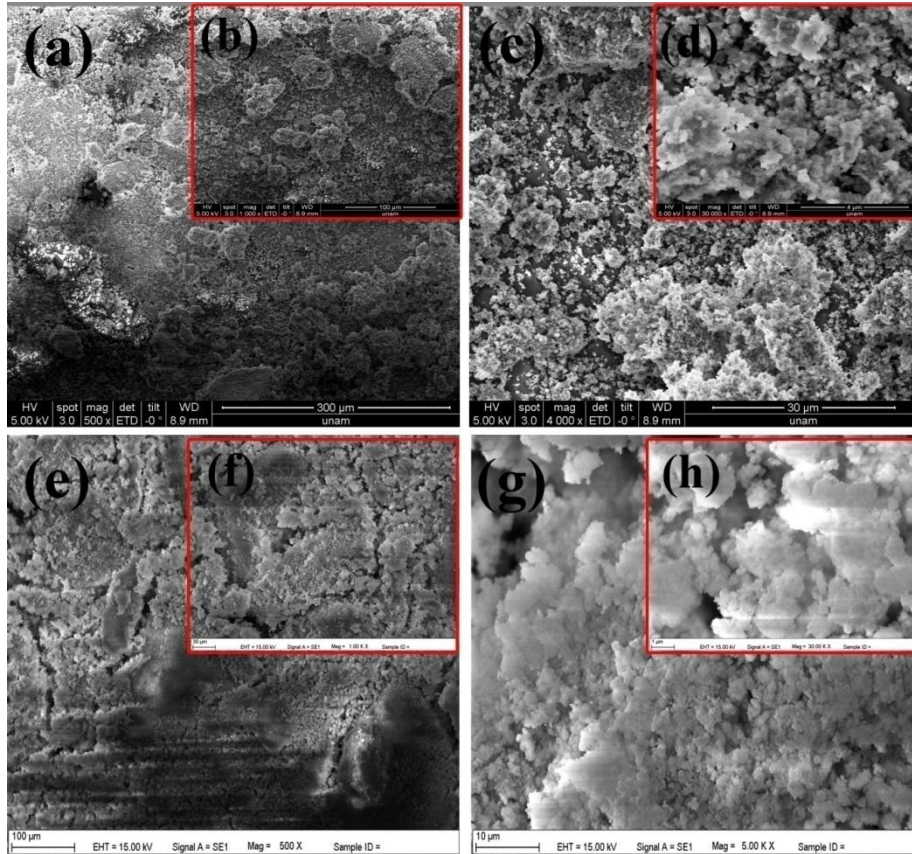
Tez çalışmasında ilk kez biyomimetik yöntemle hidroksiapatite bor katkısı sağlanmış ve bu katkı ağırlıkça 1.15 ± 0.11 olarak belirlenmiştir. Borun çoğunlukla BO_2^- olarak apatitik yapıdaki kanallara, ya da BO_3^{3-} olarak OH^- ya da PO_4^{3-} iyonları ile yer değiştirerek yapıya girdiği, çok az bir kısmının da B^{+3} iyonu şeklinde Ca^{2+} ile yer değiştirerek yapıda yer almış olduğu düşünülmüştür. HAp için 34.40 ± 0.28 olarak belirlenen %Ca değerinin B-HAp için 28.10 ± 0.28 olarak bulunmuş olması, B^{+3} iyonunun Ca^{2+} ile yer değiştirmesi olarak açıklanabilir. Aynı zamanda HAp için 16.55 ± 0.07 bulunan %P değerinin B-HAp için 15.55 ± 0.35 olarak bulunması BO_3^{3-} iyonlarının PO_4^{3-} ile yer değiştirdiğini göstermektedir. Diğer karakterizasyon sonuçları da yapıdaki bu yer değiştirmeyi desteklemektedir. B-HAp örneğinde Ca/P oranlarının bir miktar düşük bulunması ve aynı zamanda Ca/P ile uyumlu olması beklenen Ca/P+B oranının düşük olması yer değiştirme reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır.

Biyomimetik yöntemle üretilen iyon katkılı hidroksiapatitin avantajları arasında çeşitli iyonları sürekli yapısından salması ve yapısına katması nedeniyle biyolojik olarak aktif özellikte olması da yer almaktadır. Ayrıca Ternane ve ark.[120] yaptıkları çalışmada P/B oranı 7.22 olduğunda bor atomlarının tamamen yapıya katıldığını belirlemişler ve bu oran 11'den büyük olduğunda iki fazlı bir yapının oluştuğunu, 7.22'den küçük olduğunda ise bir miktar $Ca_3(BO_3)_2$ fazının da oluşacağını belirtmişlerdir. Çalışma kapsamında üretilen tüm B-HAp örnekleri arasında 7.22'ye en yakın değer olarak 4.75 bulunmuştur. Üretilen B-HAp bu

değer bakımından da literatürle uyum göstermektedir. Diğer karakterizasyon çalışmaları Çizelge 4.1'de işaretlenmiş olan iki örnek üzerinden yapılmıştır.

4.1.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDX) analizi

Üretilen HAp ve B-HAp örneklerinin morfolojileri SEM görüntüleri ile belirlenmiştir. Şekil 4.2'de toz halindeki örneklerin farklı büyütmelerdeki görüntülerine yer verilmiştir.



Şekil 4.2. Mikrodalgalı desteği ile üretilen HAp (a) 500x, (b) 1,000x, (c) 4,000x, (d) 30,000x ve B-HAp (e) 500x, (f) 1,000x, (g) 5,000x, (h) 30,000x örneklerinin SEM görüntüleri.

Şekil 4.2 incelendiğinde SBF'den çöktürme ile elde edilen örneklerin bir araya gelerek kümleler oluşturdukları görülmektedir. Yığın haldeki HAp ve B-HAp'in yapılarında morfolojik olarak belirgin bir farklılık saptanmamıştır. Ayrıca çöktürme sırasında oluşan istenmeyen fazların ya da tuz kristallerinin yapılan yıkamalar sonrası ortamdaki uzaklaştığı görülmektedir. Yığın haldeki HAp ve B-HAp için yapılan EDX analizi sonucunda ise Ca/P oranları sırasıyla 2.11 ± 0.21 ve 2.13 ± 0.74 olarak bulunmuştur. ICP-OES sonuçlarına göre yapılan hesaplamalarda ise bu

değerler HAp için 1.61, B-HAp için ise 1.40 olarak bulunmuştur. Bu farklılığın SEM-EDX analizinin, örneğin sadece belirli bölgelerinden yapılabilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Örneğin tamamından yapıldığı için, ICP-OES analizi sonuçlarının daha güvenilir olduğuna karar verilmiştir.

4.1.2.3. Elementel analiz

Biyolojik apatitlerin yapısında doğal olarak bulunan karbonat iyonunun, kemik implantlarında kullanılmak üzere üretilen hidroksiapatitlerin yapısında da bulunması oldukça önemlidir. Hidroksiapatitin yapısında bulunan CO_3^{2-} , malzemenin sinterlenebilirliğini, çözünürlüğünü ve biyolojik olarak aktifliğini etkilemektedir [136]. Murugan ve ark. [144] yaptıkları çalışmada kimyasal çöktürme ve mikrodalga yöntemlerini birleştirerek ağırlıkça %2.9 oranında CO_3^{2-} içeren hidroksiapatit üretmişlerdir. Tez çalışması kapsamında, hücre kültür çalışmalarında da kullanılmak üzere seçilen HAp ve B-HAp örneklerinin karbonat içerikleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. HAp ve B-HAp örneklerinin ağırlıkça % CO_3^{2-} oranları.

Örnek	CO_3^{2-} (w/w, %)
HAp	7.15±0.28
B-HAp	4.30±0.07

İnsan vücudundaki biyolojik apatitlerin karbonat içerikleri yaşa, cinsiyete ve bulunduğu dokuya göre ağırlıkça %3-8 arasında değişmektedir. Çizelge 4.2 incelendiğinde bulunan karbonat içeriklerinin biyolojik apatitler ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Bor katkılı hidroksiapatitin yapısındaki karbonat içeriğinin azalmasının nedeni, CO_3^{2-} iyonlarının ortamda bulunan BO_3^{3-} iyonları ile yarışmalı olarak OH^- ya da PO_4^{3-} iyonları ile yer değiştirmesidir. Bu sonuç ATR-FTIR analizindeki karbonat pikleri ile de uyumludur.

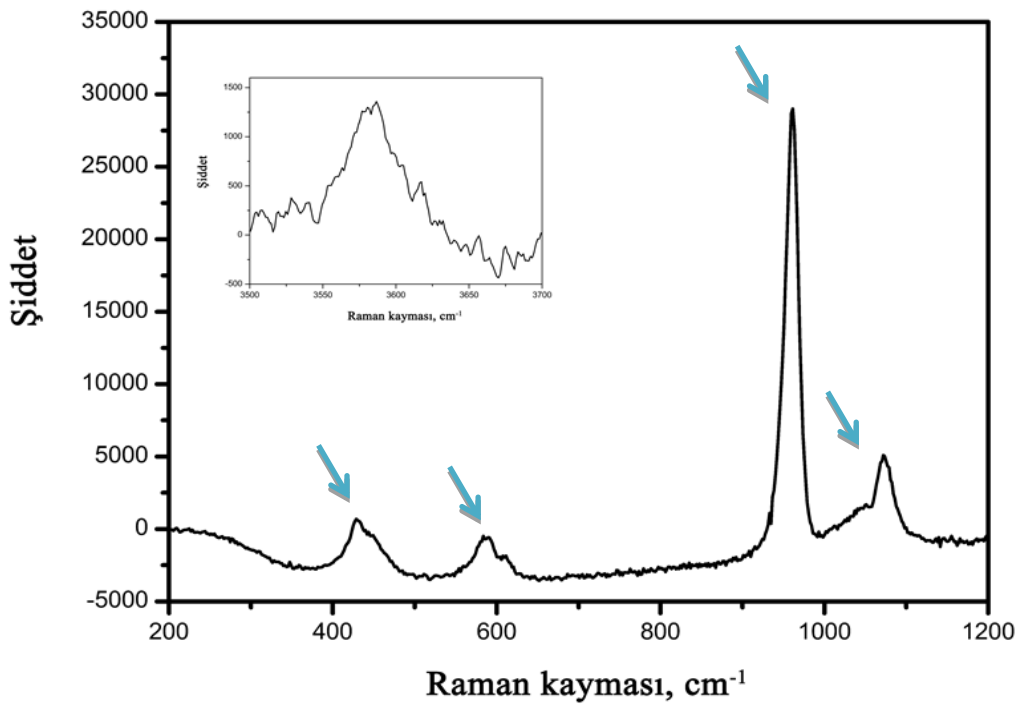
4.1.2.4. Raman spektroskopisi

Çalışmalar kapsamında yapılan Raman ve infrared spektroskopi analizleri birbirini tamamlarlar niteliktedir.

Moleküllerin şiddetli bir monokromatik ışın demeti ile etkileşmesi sırasında, ışık absorpsiyonu gerçekleşmiyorsa, ışık saçılması meydana gelir. Işık saçılması

sırasında, saçılan ışığın büyük bir kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur ve bu tür elastik saçılma olayına *Rayleigh saçılması* denir. Elastik saçılma olayının yanı sıra saçılan ışığın çok az bir kısmı ise molekül ile etkileşime giren ışığın enerjisinden daha farklı enerjilerle saçılır. Bu tür elastik olmayan saçılma olayı ise *Raman saçılması* adını alır. Raman saçılması sırasında saçılan ışığın enerjisinde, molekül ile etkileşen ışığınkine göre oluşan fazlalık veya azlık, ışıkla etkileşen molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki enerji farkı kadardır. Bu nedenle *Raman saçılmasının* spektroskopik incelenmesi ile de moleküllerin titreşim enerji düzeyleri hakkında bilgi edinilebilir.

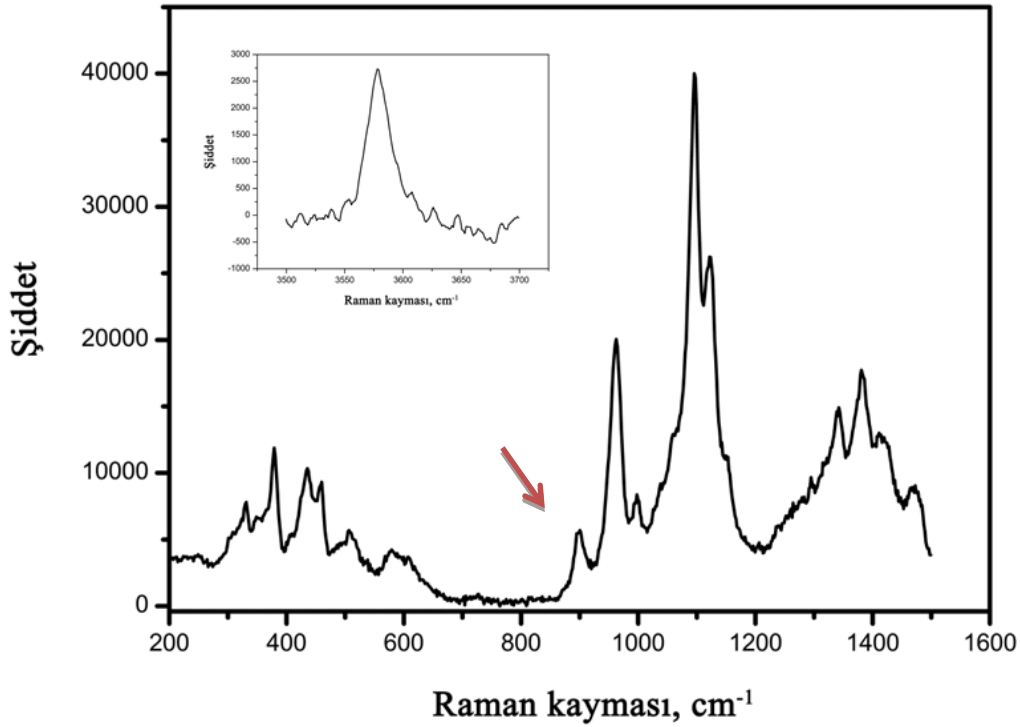
Moleküllerin infrared fotonunu absorblayabilmesi, yani molekülün bu fotonla rezonansa girebilmesi için, molekül titreşirken dipol momentinde periyodik ve fotonun frekansına eşit frekanslı bir değişimin olması gereklidir. Bir molekülün bir fotonla Raman türü saçılma etkileşmesine girebilmesi için ise, molekülün titreşimi sırasında etkileştiği fotonun elektrik alanı tarafından periyodik ve fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi, yani periyodik ve geçici bir dipol momentinin oluşması gereklidir. Kısacası, bir titreşim şeklinin Raman aktifliği onun infrared aktivitesinden çok farklıdır.



Şekil 4.3. HAp örneğine ait Raman spektrumu.

Üretilen HAp ve B-HAp örneğine ait Raman spektrumları sırasıyla Şekil 4.3 ve 4.4'te verilmiştir. PO_4^{3-} gruplarına ait tüm titreşim pikleri her iki örnek için de görülmüştür. Yaklaşık olarak $961\text{-}962\text{ cm}^{-1}$ de görülen PO_4^{3-} simetrik gerilme piki hidroksiapatitler için karakteristiktir. 447 , 433 ve 603 cm^{-1} 'deki pikler ise yapıdaki PO_4^{3-} bükülme titreşimlerini göstermektedir. PO_4^{3-} 'e ait asimetrik gerilme titreşimleri 1076 , 1054 , 1046 ve 1030 cm^{-1} civarlarında bulunmuştur [145].

Şekil 4.3 ve 4.4'te sol üst köşede verilmiş grafiklerde yaklaşık 3570 cm^{-1} 'de yapılarda bulunan karakteristik OH^- grubuna ait gerilim titreşimleri gösterilmiştir.



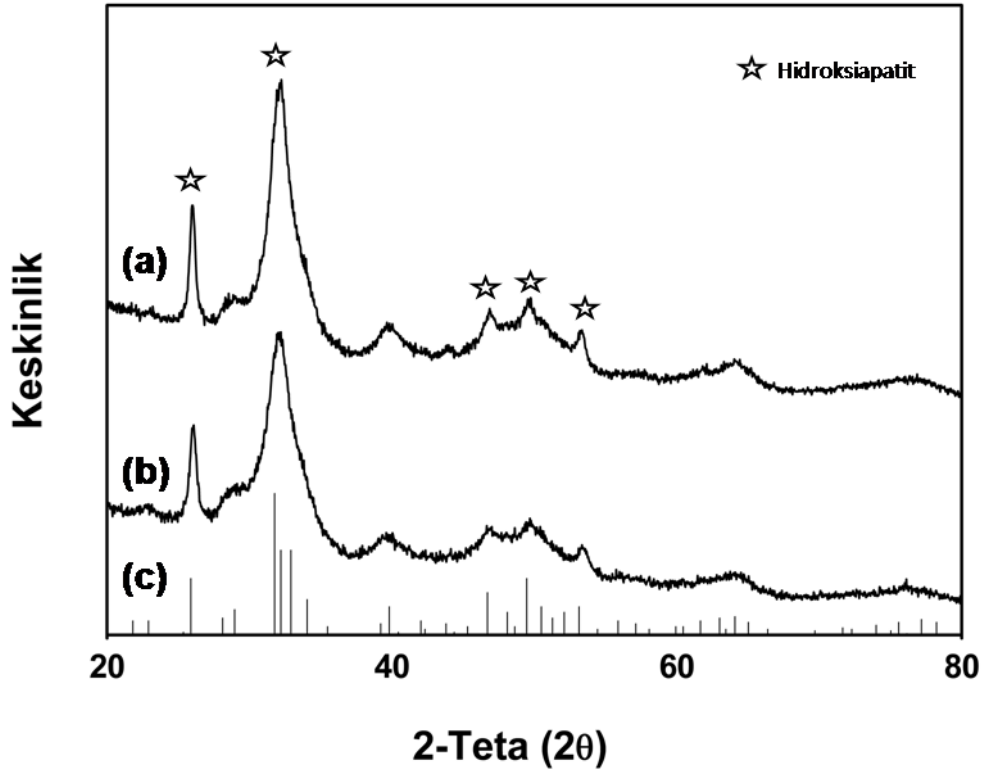
Şekil 4.4. B-HAp örneğine ait Raman spektrumu.

Bor katkılı hidroksiapatit yapısında bulunan BO_3^{3-} simetrik gerilim titreşimi ise 912 cm^{-1} 'de görülmüştür [120]. Raman spektroskopisi sonuçları ile yapıdaki borun varlığı bir kez daha kanıtlanmaktadır.

4.1.2.5. X ışını kırınımı (XRD) analizi

HAp ve B-HAp örneklerine ait XRD grafikleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Hidroksiapatitin karakteristik pikleri olan 26° ve 32° [146] pikleri her iki hidroksiapatit yapısında da görülmüştür. Spektrumlar incelendiğinde, bor katılımının dikalsiyum fosfat anhidroz (DCP), dikalsiyum fosfat dihidrat (DCDP) ya da β -trikalsiyum fosfat (β -TCP)

gibifarklı fazlar oluşmasına neden olmadığı ve yalnızca tek fazlı (sadece HAp içeren) yapıların oluştuğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Çalışma kapsamında mikrodalga ile sentezlenen HAp (a), B-HAp (b) ve Kırınım Verileri için Uluslar Arası Merkez'den (ICDD) alınan saf HAp (c) örneklerine ait XRD spektrumları.

Stokiyometrik hidroksiapatit tamamen kristal yapıdadır, ancak çalışma kapsamında üretilen hidroksiapatit ve bor katkılı hidroksiapatit kristal yapıda değildir. XRD desenleri incelendiğinde stokiyometrik hidroksiapatitte (Şekil 4.5 c) çok keskin olarak görülen piklerin, HAp ve B-HAp örneklerinde keskin olmadığı açıkça görülmektedir. Pik genişlemesi ve pik keskinliğindeki azalmalar, doğal kemik yapısına benzerlikler göstermektedir [147]. Kemik benzeri bu apatitler, yarı kristalin yarı amorf özelliktedirler. Bor katkısının hidroksiapatitin kristalinitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir.

4.1.2.6. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

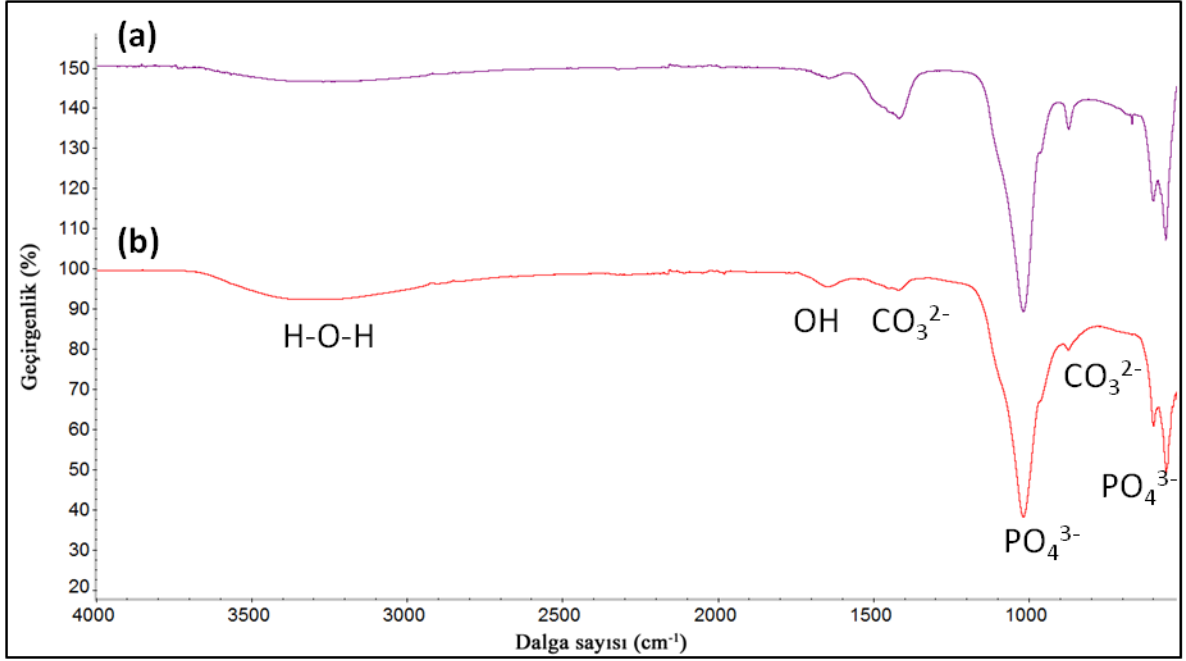
Çalışma kapsamında üretilen HAp ve B-HAp yapılarına ait ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.6'da verilmiştir. Her iki spektrumda da absorblanan suya ya da hidroksiapatitin yapısında bulunan suya, hidroksil, fosfat ve karbonat iyonlarına ait tüm pikler gözlenmiştir.

600 W mikrodalga gücünde biyomimetik yöntemle üretilen HAp ve B-HAp örneklerinin ATR-FTIR spektrumu incelendiğinde, ~1015 ve 958 cm^{-1} civarlarında hidroksiapatit için karakteristik PO_4^{3-} gerilim titreşimine ve 599, 557 cm^{-1} PO_4^{3-} eğilme titreşimine ait bantlar saptanmıştır. 3000-3600 cm^{-1} aralığında görülen yaygın bant hidroksiapatitin yapısına absorblanmış bağlı suyu, ~1641 cm^{-1} de gözlenen pik ise bağlı olmayan suyun varlığını göstermektedir. Çizelge 4.3'te ATR-FTIR spektrumlarında HAp ve B-HAp için görülmesi beklenen ve görülen pikler ve açıklamalarına yer verilmiştir.

Çizelge 4.3. HAp ve B-HAp için görülmesi beklenen ve görülen pikler.

Dalga sayısı (cm^{-1})	HAp	B-HAp	Titreşim türü
3000-3600	3251	3269	OH gerilme
1642	1641	1644	OH
962	958	952	PO_4^{3-} simetrik gerilme
1090, 1062, 1030	1015	1015	PO_4^{3-} asimetric eğilme
571, 603	557, 599	557, 596	PO_4^{3-} asimetric gerilme
1304, 1253, 1208	-	-	BO_3^{3-} asimetric gerilme
804, 784, 771, 755	-	-	BO_3^{3-} simetrik eğilme
2007, 2002, 1932	-	-	BO_2^- asimetric gerilme
868, 1432, 1499	872, 1416, 1487	1416, 869	CO_3^{2-}

FTIR spekturumda 1304, 1253, 1208 cm^{-1} ve 784, 771, 755 cm^{-1} civarlarında BO_3^{3-} grubuna ait, sırasıyla asimetric gerilme ve simetrik eğilme bantlarının görülmesi beklenmektedir. 2002 cm^{-1} ve 1932 cm^{-1} de görülmesi beklenen bantlar ise BO_2^- grubuna ait asimetric gerilme bantlarıdır. B-HAp yapısında bulunan BO_3^{3-} ve kristal yapının boşluklarına giren BO_2^- 'nin varlığı ICP-OES analizleri ile gösterilmiş olmasına rağmen hem yapıda ortalama %1.15 civarı bulunduğundan hem de boratlara ait pikler çok zayıf olduğundan, FTIR spektrumunda borat pikleri gözlenememiştir. Ancak HAp spektrumu ile B-HAp spektrumu karşılaştırıldığında, karbonat piklerinin HAp spektrumunda daha belirgin olduğu açıkça görülmektedir. Böylece elementel analiz sonuçlarında da bahsedilen BO_3^{3-} iyonunun CO_3^{2-} ile yarışmalı olarak PO_4^{3-} ya da OH^- ile yer değiştirmesi ve buna bağlı olarak, B-HAp'nin yapısındaki CO_3^{2-} miktarının azalması, ATR-FTIR sonuçları ile de desteklenmektedir.



Şekil 4.6. HAp (a) ve B-HAp (b) örneklerine ait ATR-FTIR spektrumları.

Kemiğin mineral yapısındaki hidroksiapatit, kalsiyum eksik ve zayıf kristalin yapıdadır. Stokiyometrik olmayan bu apatitler çeşitli iyonları da yapılarında bulundurlar. Örneğin Na^+ ve Mg^{2+} iyonları Ca^{2+} iyonu ile, HPO_4^{2-} iyonu fosfat iyonu ile, F ve Cl^- iyonları ise OH^- iyonu ile yer değiştirebilir. Ayrıca kemiğin mineral kısmında %3-8 oranında bulunan karbonat iyonları OH^- ile yer değiştirirse A tipi, PO_4^{3-} ile yer değiştirirse B tipi apatit oluşur[144, 148]. Örneklerin her ikisinde de 1499-1416 cm^{-1} aralığındaki ve 872 cm^{-1} 'de civarında görülen pikler çökme sırasında atmosferden ve SBF'den gelen CO_3^{2-} iyonunun varlığından kaynaklanmaktadır. FTIR spektrumlarında CO_3^{2-} , 880 cm^{-1} 'de 2 bant ve 1450 and 1540 cm^{-1} civarlarında 3 bant vermiş ise apatit A tipi, 870, 1430 and 1450 cm^{-1} civarlarında bantlar vermiş ise B tipi apatit yapısı elde edilmiş demektir[148, 149]. Bor katkılı hidroksiapatit örneklerinde karbonat iyonu ile yarışmalı olarak yapıya katılan borat iyonları da yer değiştirme sonrasında A tipi ya da B tipi hidroksiapatit oluşmasına neden olmaktadır. Çalışma kapsamında üretilen HAp örneklerinde karbonat iyonu çoğunlukla OH^- ile yer değiştirmiş ve bant $\sim 872 \text{ cm}^{-1}$ değerinde gözlenmiştir, bu da A tipi apatit yapısını desteklemektedir.

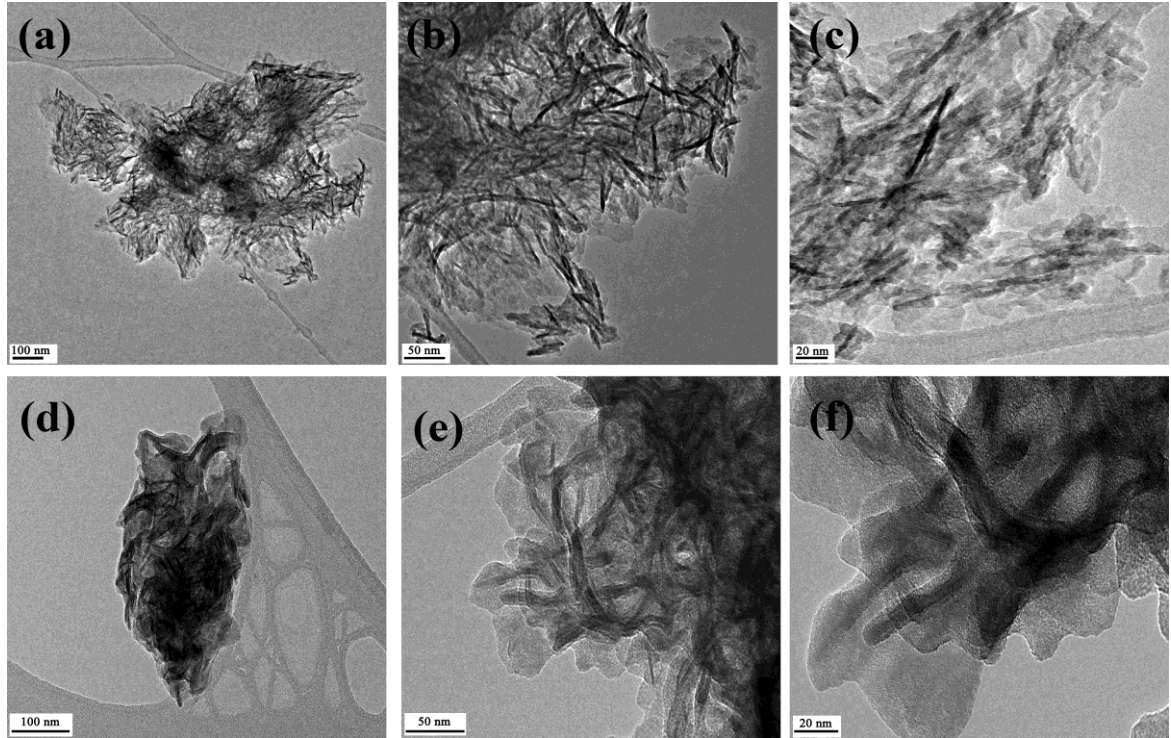
4.1.2.7. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Üretilen HAp ve B-HAp örneklerinin morfolojileri ve kristal yapıları TEM analizi ile incelenmiştir. SEM görüntülerinde kümeler oluşturarak bir araya gelen

hidroksiapatit taneciklerinin yapısı TEM analizlerinde daha belirgin olarak Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Günümüze kadar geliştirilen hidroksiapatit sentez yöntemleriyle nanotel, mikroküre, nano çubuk, mikro tabaka, çiçek ya da plaka benzeri yapılar gibi çok farklı morfolojilerde nano/mikro kristal yapıda hidroksiapatitler üretilmiştir [20].

Kemik matrisi, kollajen nanofiberler boyunca uzanan plaka ya da çubuk benzeri HAp nanopartiküllerden oluşmaktadır ve bu morfolojide HAp nanopartiküller içeren biyomalzemelerin biyomimetik yaklaşım çerçevesinde daha başarılı olduğu bilinmektedir [5, 150]. Çalışma kapsamında mikrodalga yardımı ile üretilen örneklerin TEM görüntüleri incelendiğinde HAp ve B-HAp örneklerinin morfolojileri arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Bor katkısı ile hidroksiapatit nanopartiküller iğne benzeri morfolojiden, çubuk benzeri morfolojiye doğru değişim göstermişlerdir. Ayrıca, hidroksiapatitin partikül boyu ortalama 40-50 nm uzunluğunda iken (Şekil 4.7 a, b ve c), bor katkılı hidroksiapatitin partikül boyu 20-30 nm'ye (Şekil 4.7 d, e ve f) küçülmüştür.



Şekil 4.7. Mikrodalga desteği ile üretilen HAp (a, b ve c) ve B-HAp (d, e ve f) örneklerine ait TEM görüntüleri. Barlar sırasıyla a ve d) 100nm, b ve e) 50 nm, c ve f) 20 nm uzunlukları işaret etmektedir.

4.1.2.8. Üretim verimi

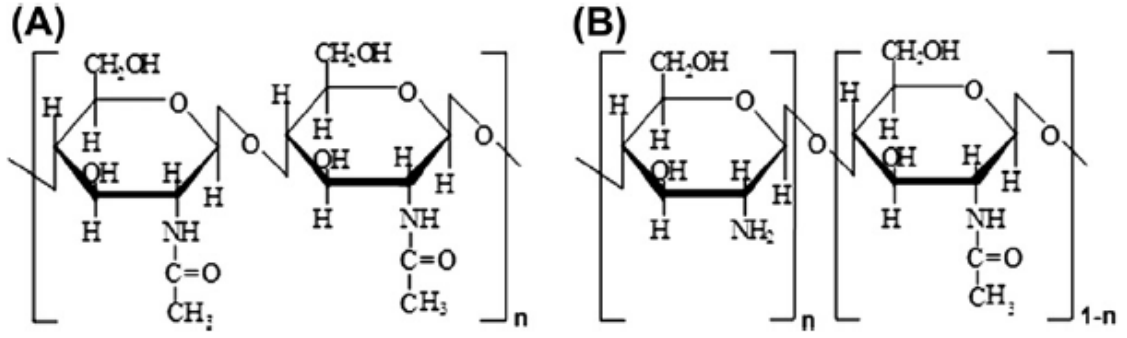
HAp ve B-HAp sentezinde kullanılan üretim koşulları, üretim miktarlarını önemli ölçüde etkilemektedir. Üretim miktarları da kemik dolgu maddesi ya da kaplama amacıyla kullanılacak olan hidroksiapatitler için önem taşımaktadır. Çizelge 4.4'te çalışma kapsamında üretilen HAp ve B-HAp örneklerine ait gravimetrik analiz sonuçları verilmiştir. Hidroksiapatitler karşılaştırıldığında, mikrodalga yardımıyla belirlenen koşullarda üretilen hidroksiapatitin oda sıcaklığında çöktürme ile üretilen hidroksiapatitten yaklaşık 3 kat daha verimli şekilde elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca bor katkısı yapıldığında SBF'den oda sıcaklığında herhangi bir çökeltme gözlenmemiştir. B-HAp üretimi, ancak mikrodalga ya da ısı uygulamaları varlığında gerçekleştirilmektedir. Hem üretim verimi, hem de diğer karakterizasyon sonuçları incelendiğinde 600 W mikrodalga ile B-HAp üretilmesi uygun bulunmuştur. Mikrodalga desteği ile üretilen HAp ve B-HAp karşılaştırıldığında ise B-HAp üretim verimi, yapıya katılan borat iyonları nedeniyle SBF iyon dengesindeki değişimden dolayı azalmıştır, ancak kaplamalar yapıldığında bu miktarda belirlenen hedef için yeterli olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.4.Farklı yöntemler ile hazırlanan HAp ve B-HAp örneklerinin ürün verimleri.

Örnek	Üretim Yöntemi	Ürün verimi (g/100mL)
HAp	Oda sıcaklığı	0.0100±0.009
HAp	600W	0.0340±0.003
B-HAp	Oda sıcaklığı	Çökeltme gözlenmedi
B-HAp	600 W	0.0258±0.002

4.2. Kompozit Doku İskelelerinin Üretilmesi Ve Karakterizasyonu

Kitosan, doğada en çok bulunan ikinci polisakkarit olan kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilmektedir. Kitin doğada, krustaseler, böcekler ve örümcekler gibi omurgasızların dış iskeletinde, fungi ve bazı alglerin ise hücre duvarlarında bulunmaktadır. Kitin, tekrarlayan *N*-asetil-D-glukozamin alt birimlerin $\beta(1\rightarrow4)$ bağı ile bağlanmasından oluşmuş bir homopolimerdir. Kitosan ise, *N*-glukozamin ve *N*-asetil glukozamin birimlerinin $\beta(1\rightarrow3)$ glikozidik bağları ile bir araya gelmesinden oluşan lineer bir polisakkarittir. Kitin ve kitosanın yapısı Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



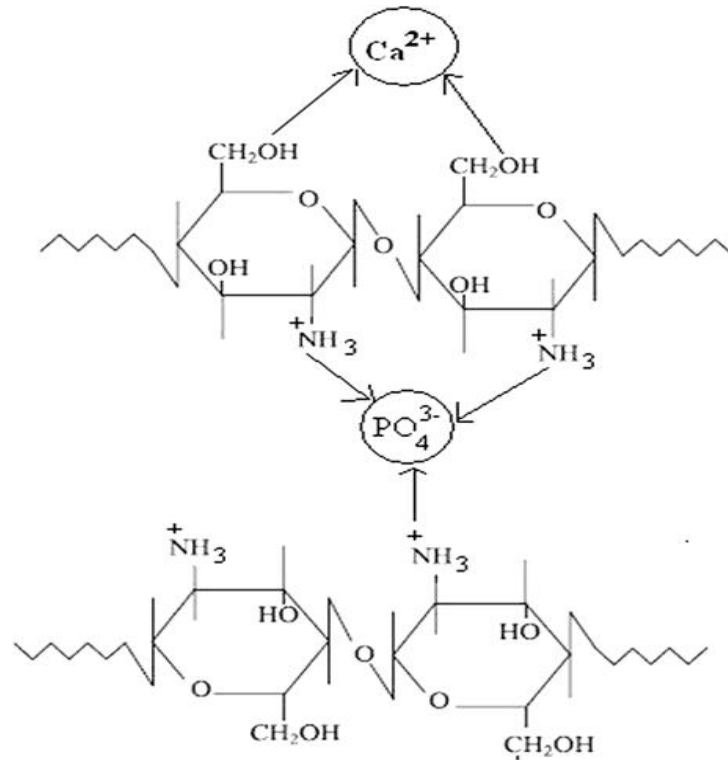
Şekil 4.8. Kitin(a) ve kitosanın(b) kimyasal yapısı.

Kitosanın *in vivo* degradasyonu hidroliz ile ve enzimatik olarak gerçekleşir. Degradasyon hızı deasetilasyon derecesi ile değişen kristalinitesine bağlıdır. Yüksek deasetilasyon derecesine (>%85) sahip kitosan düşük degradasyon hızına sahiptir. Kitosanın degradasyon ürünleri çeşitli uzunluklardaki oligosakkaritlerdir. Kitosan pH 7'nin üzerindeki sulu çözeltilerde çözünmez, ancak seyreltik asitlerde serbest amino grupları protonlanır ve pH 5 civarında molekül tamamen çözünür hale gelir. pH bağımlı çözünme özelliği sayesinde işlenebilirliği kolaydır. Böylece hem film hemde üç boyutlu doku iskelesi şeklinde tasarlanabilir. Katyonik yapısı nedeniyle anyonik glikozaminoglikanlar (GAG), proteoglikanlar ve diğer negatif yüklü moleküllerle etkileşime girebilir. Kısaca kitosan biyobozunurluğu, biyouyumluluğu, alkali çözeltilerdeki stabilitesi, antibakteriyal özelliği ve yara iyileşmesinde görev alması sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında öne çıkan bir biyomalzemedir [42, 151].

Ancak kitosan biyoaktif özelliğe sahip değildir ve bu nedenle uygun biçimde modifiye edilerek kullanılmasına ihtiyaç duymaktadır [152]. Birçok çalışmada kitosan ile biyoaktif bir malzeme olan hidroksiapatit bir araya getirilerek kompozit bir malzeme üretilmesi amaçlanmıştır. Genellikle bu üretimler kitosan yapılarının HAp ile kaplanması şeklinde gerçekleştirilir. Hidroksiapatit kaplama için plazma spreyleme, iyon püskürtme, sol-jel birikim gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler ile elde edilen apatit kaplamalar, yüksek kristal özellikte olmakta ve kemik benzeri yapıda olmamaktadırlar. Ayrıca, bu yöntemler ile homojen ve ince bir yüzey kaplaması elde edilmesi de oldukça zordur. Yukarıda bahsedilen yöntemlere alternatif olarak geliştirilen biyomimetik yöntem ile düşük kristaliniteye sahip, kemik benzeri apatit elde edilebilmektedir [153]. Tuzlakoğlu ve ark. [153] kitosan fiberlerden ürettikleri doku iskelesini önce yüzeyde apatit

çekirdeklenmesini kolaylaştıracak silinol (Si–OH) grupları oluşturmak üzere modifiye etmişler daha sonra biyomimetik yöntem ile 7 gün boyunca 1.5xSBF kullanarak kalsiyum fosfat tabakası oluşmasını sağlamışlardır. Leonor ve ark.[154] ise hazırladıkları kitosan mikrokürelerikalsiyum silikat çözeltisi ile muamele ederek silinol grupları oluşturmuşlar ve SBF içinde 1 gün bekleterek yeterli kalsiyum fosfat fazını elde etmişlerdir. Kitosan ve hidroksiapatit kompozitlerinin geliştirilmesi için yapılan pek çok farklı çalışmaya rağmen organik ve inorganik yapılar arasında, ara yüzey bağlantısının, herhangi bir yüzey modifikasyonu olmadan sağlanması oldukça zordur.

Kitosan gibi organik polimerlerde bulunan karboksil grupları apatit çekirdeklenmesini uyarmaktadır. Karboksil grupları üzerinden Ca^{2+} , amin grupları üzerinden ise fosfat grupları öncelikli olarak bağlanır (Şekil 4.9). Ancak karboksil gruplarında uyarılmaya ihtiyaç duyar. Kitosan SBF'ye daldırılmadan önce $Ca(OH)_2$ ile muamele edilirse, karboksil gruplarına Ca^{2+} bağlanır, karboksil grupları Ca^{2+} salar ve böylece SBF içindeki iyonik aktivite dolayısıyla çekirdeklenme artar [155].



Şekil 4.9. Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonlarının kitosan zincirlerine bağlanmasının şematik gösterimi[156].

Osteoindüktif etkisi bilinen bor, literatürde sınırlı sayıda çalışmada doku iskelesi yapısına katılmıştır. Wu ve ark. [88] borun osteoblastlar ve doku iskelesinin yapısı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, gözenekli biyoaktif cam doku iskeleleri üretmişlerdir. Bor katkılı doku iskelelerinden salınan bor iyonunun osteoblast çoğalmasını ve RunX2, Kol-I gibi önemli genlerin ifadelerini arttırdığını belirlemişlerdir. Kromka ve ark. [157] tarafından yapılan çalışmada da, katkısız ve artan derişimlerde bor katkılı nanokristalin elmas (NCD) filmler, MG-63 osteoblast benzeri hücre kültürleri için yapay substrat olarak kullanılmıştır. NCD filmlerde bor katkısının artışı ile iletkenliğin ve yüzey yükünün arttığı gözlenmiştir. Bütün NCD substratlarının hücreler ile yüksek biyouyumluluk gösterdiği ve MG-63 hücre yapışmasını ve büyümesini uyardığı kanıtlanmıştır.

Sunulan tez çalışması kapsamında, dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan kitosan doku iskelelerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bor katkılı doku iskeleleri elde edilmesi amacıyla, HAp'in osteokondüktif ve borun osteoindüktif etkileri birleştirilerek biyomimetik yöntemle, kitosan doku iskelelerinin kaplanması sağlanmış ve bor katkılı kompozit doku iskeleleri (B-HAp/kitosan) üretilmiştir. Biyomimetik yöntem ise hem SBF içindeki iyonların hem de kitosan yüzeyindeki grupların uyarılması ve böylece etkin bir kaplanmanın sağlanması için mikrodalga ile desteklenmiştir. Aynı zamanda borun etkisinin daha iyi değerlendirilmesi amacıyla sadece HAp kaplamaya sahip HAp/kitosan doku iskeleleri de üretilmiştir.

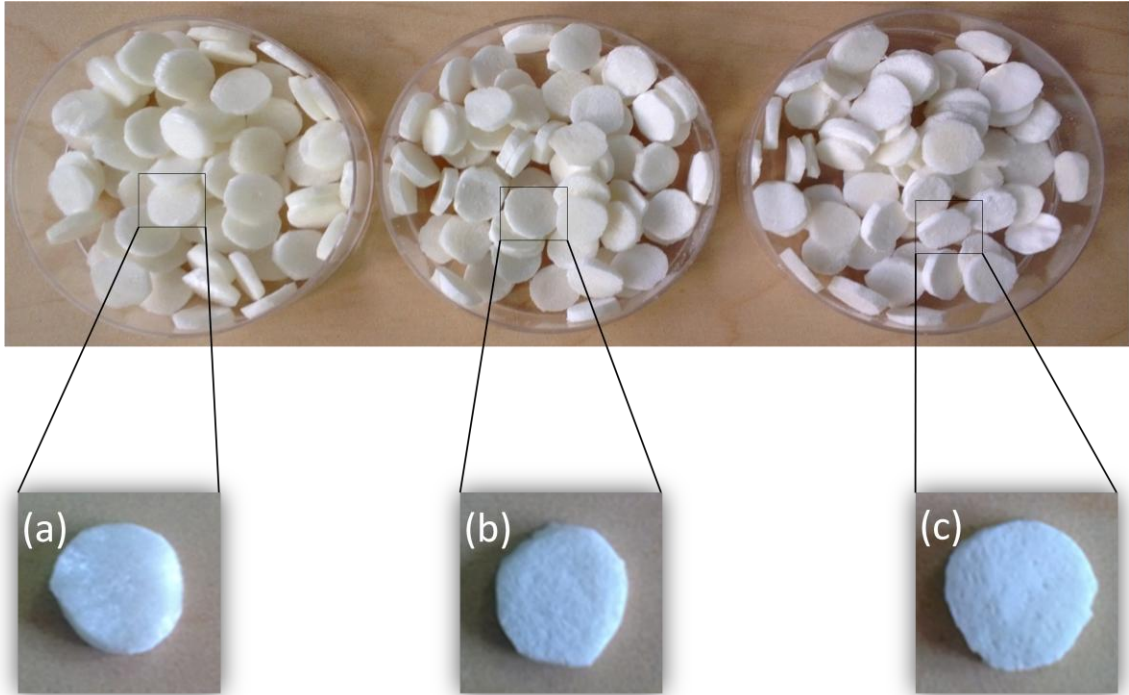
4.2.1. Kitosan, B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan doku iskelelerinin üretimi

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kitosan doku iskeleleri dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmıştır. Dondurarak kurutma yönteminde, dondurma sırasında, çözelti içerisinde oluşan buz kristalleri liyofilizasyon ile uzaklaştırılarak içsel bağlantılara sahip gözenekli yapılar elde edilmektedir[151].Dondurma koşulları değiştirilerek gözenek boyutlarının, 1-250µm arasında olması sağlanabilmektedir [158]. Homojen gözenekliliğin elde edildiği bu yöntem, aynı zamanda üretim koşullarının kolaylığı ve maliyet açısından diğer yöntemlerden daha avantajlıdır. Doku iskelelerinin üretimi, grubumuz tarafından önceden belirlenmiş olan koşullarda gerçekleştirilmiştir[151]. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan kompozit doku iskelelerinin mineral fazıise SBF kullanılarak mikrodalga desteği ile oluşturulmuştur. Bu sayede, kitosanın yüzeyinde bulunan ve amorf kalsiyum fosfat çekirdeklenmesine yardımcı olacak fonksiyonel grupların (OH^- , NH_2^+) uyarılması

sağlanmıştır. Mikrodalga etkisine maruz kalan kitosanda bulunan polar OH^- ve NH_2^+ grupları mikrodalgayı absorblar ve meydana gelen yüksek enerji OH^- ve NH_2^+ bağlarının kırılarak, radikal gruplar oluşmasına neden olabilir [159]. Mikrodalga etkisi ile fonksiyonel gruplarını aktive olan kitosan çekirdeklenmeyi uyarabilir. Mikrodalğanın reaksiyon için gerekli Gibbs serbest enerjisini düşürme etkisinin bulunması da, SBF içerisinde ve kitosanın aktive olmuş bölgelerinde çekirdeklenmenin artmasını desteklemektedir.

Sunulan tez çalışmasında, kitosanın yüzeyinde silinol (Si-OH) grupları oluşturmak gibi bir modifikasyona ihtiyaç duyulmadan, mikrodalga enerjisinin desteği ile kısa sürede, etkin bir kaplama yapılması sağlanmıştır

Kompozit doku iskelelerinin üretimi, SBF ve B-SBF içerisindeki kitosan doku iskelelerinin mikrodalga yardımıyla, 600 W gücünde 30 s x 9 tekrar ile 4 kez kaplanmasıyla gerçekleştirilmiştir. İlk 3 kaplamada yeterli miktarda kaplama yapılamadığı grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan kitosan (a), HAp/kitosan (b) ve B-HAp/kitosan (c) doku iskelelerinin görüntüleri.

Şekil 4.10'da çalışma kapsamında üretilen doku iskelelerine ait görüntüler incelendiğinde, yapılan HAp ve B-HAp kaplamanın (Şekil 4.10 b,c) iskeleyi daha

kararlı hale getirdiği açıkça görülmektedir. Özellikle B-HAp kaplamanın daha yoğun ve daha sıkı bir görüntüye neden olduğu belirlenmiştir.

B-HAp kaplı kitosan doku iskelelerinin ortalama kaplama miktarı gravimetrik yöntemlerle hesaplanmış ve ICP-OES sonucundan yola çıkılarak, her bir doku iskelesinde bulunan bor miktarı yaklaşık 20 µg olarak belirlenmiştir

4.2.2. B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan doku iskelelerinin karakterizasyonu

4.2.2.1. ATR-FTIR analizi

Biyomimetik yöntemle yapılan kaplamanın varlığını gösterebilmek amacıyla, kitosan, HAp/kitosan, B-HAp/kitosan doku iskelelerine ait ATR-FTIR analizleri yapılmıştır.

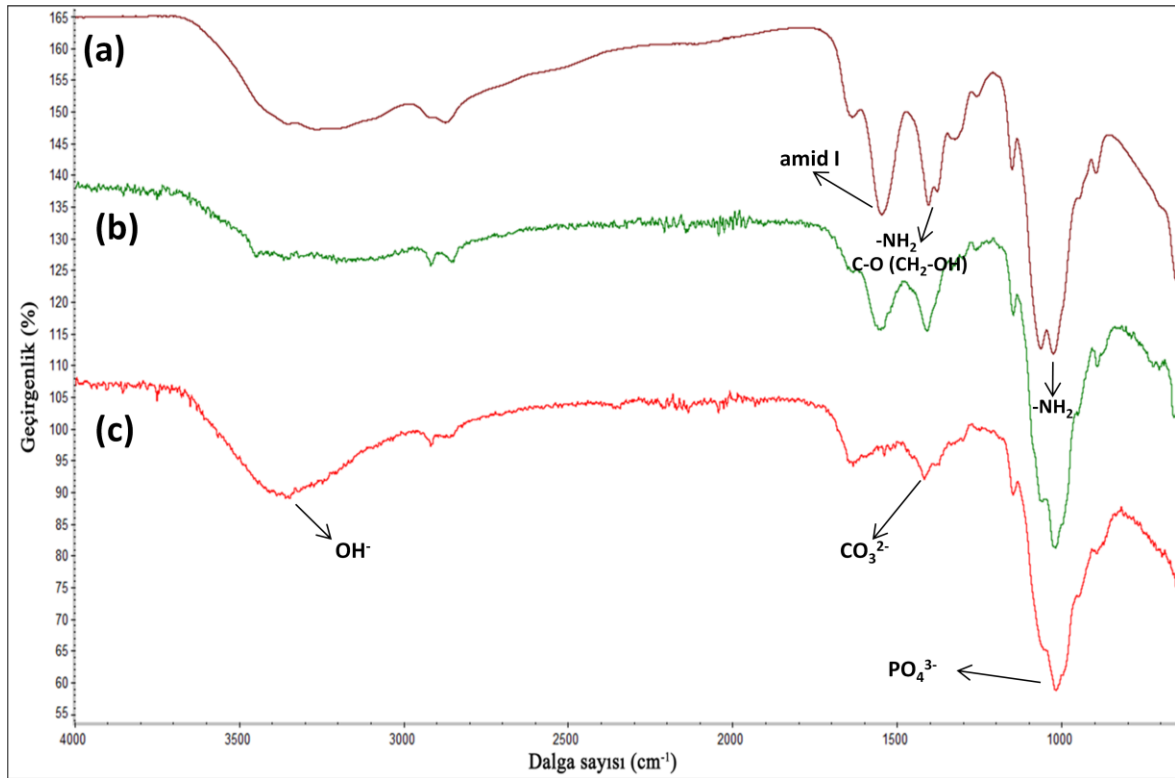
Tez kapsamında üretilen kitosan, HAp/kitosan, B-HAp/kitosan doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.11'de verilmiştir. Şekil 4.11(a)' da verilen saf kitosana ait spektrumda yaklaşık 3459 cm⁻¹'de görülen bant N-H simetrik gerilme titreşimine aittir. 1635 cm⁻¹ amid I, 1549 cm⁻¹ amid II, 1404cm⁻¹ C-H eğilme, 1151, 1065 ve 1021 cm⁻¹'de C-O-C gerilme titreşimlerine ait tüm karakteristik pikler görülmüştür. Şekil 4.11 b ve c'deki kompozit doku iskelesi spektrumlarında yaklaşık 3300-3500 cm⁻¹ 'de görülen geniş pikler apatit yapısındaki bağlı sudan ve örneğin içerdiği nemden kaynaklanmaktadır. Kitosana ait N-H simetrik gerilme titreşimi de bu bölgede olduğundan kompozit iskelelerde bu bant daha güçlü hale gelmiştir.

HAp/kitosan ve B-HAp/kitosana ait spektrumlarda yaklaşık 1050 cm⁻¹'de görülen bant kitosandaki serbest amino gruplarına ve hidroksiapatitteki fosfat gruplarına ait piklerin çakışması nedeniyle daha güçlü hale gelmiştir ve apatit yapısındaki PO₄³⁻ ile kitosanın etkileşimini ifade etmektedir [160]. Spektrumdaki 1490 cm⁻¹ civarındaki pik apatit yapısına katılmış olan CO₃²⁻ iyonuna aittir.

Çizelge 4.5'te kitosana ait pikler verilmiştir. Kompozit yapılarda bunlara ek olarak hidroksiapatite ait 955 cm⁻¹P-O gerilme titreşimi, 635 cm⁻¹ O-H eğilme titreşimi gözlenmektedir [156, 161].

Çizelge 4.5. Kitosana ait karakteristik FTIR bantları.

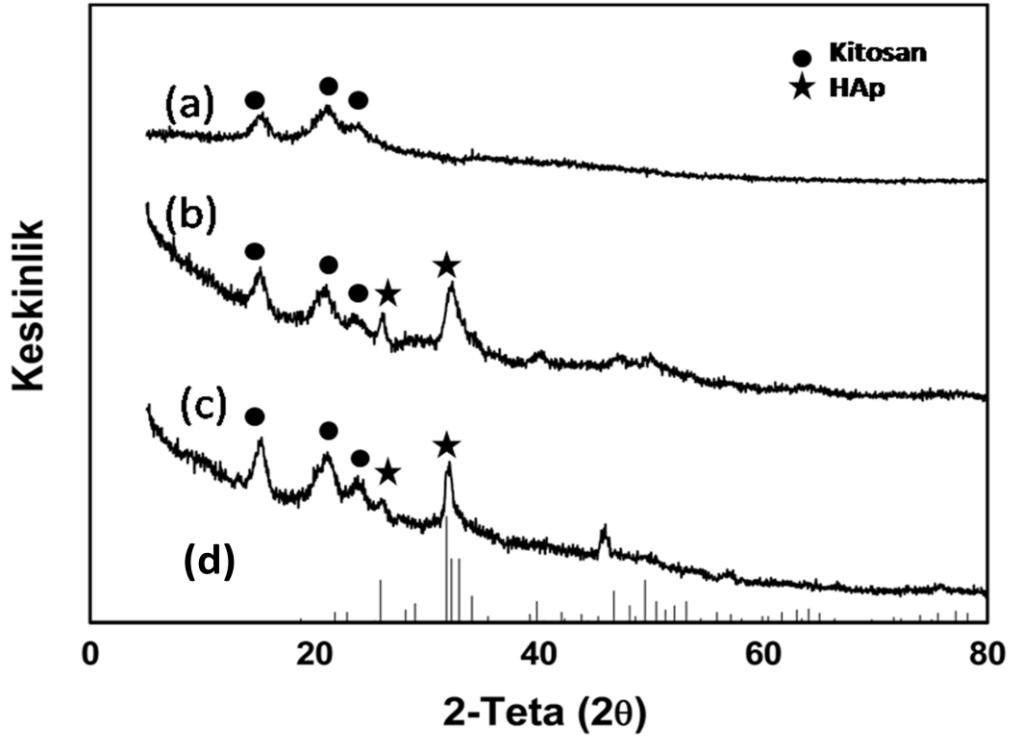
Pik Değerleri (cm ⁻¹)	Açıklama
3459-3454	N-H simetrik gerilme
1650-1642-1654-1632	Amid I
1595-1586	Amid II
1420	C-H eğilme
1153, 1070, 1031	C-O-C simetrik ve asimetric gerilme
899	C-O



Şekil 4.11. Çalışma kapsamında hazırlanan kitosan (a), HAp/kitosan (b) ve B-HAp/kitosan (c) doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları.

4.2.2.2. XRD analizi

Çalışma kapsamında yapılan kaplama çalışmaları ile kompozit yapılarda oluşturulan mineral fazın varlığını belirlemek için XRD analizleri yapılmıştır. Hazırlanan kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelelerine ait XRD grafikleri Şekil 4.12'de verilmiştir.



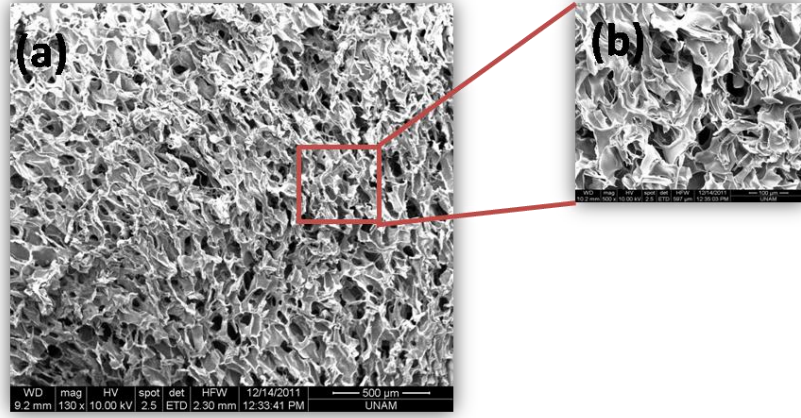
Şekil 4.12. Kitosan doku iskelesi (a) ve mikrodalga yardımı ile (600 W) HAp (b), B-HAp (c) kaplanmış kitosan doku iskelelerine ve Kırınım Verileri için Uluslar Arası Merkez'den (ICDD) alınan saf HAp' ye (d) ait XRD grafikleri.

Kompozit yapılarıdaki hidroksiapatit 600 W mikrodalga gücünde 9 x30s'de 4 defa kaplama yapılarak elde edilmiştir. Bütün doku iskelelerinde kitosana ait karakteristik pik $2\theta=10^\circ$ ve $2\theta=20^\circ$ civarlarında görülmüştür [162]. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelelerinde ise karakteristik kitosan pikinin yanı sıra karakteristik HAp pikleri olan $2\theta=26^\circ$ ve $2\theta=32^\circ$ pikleri de tespit edilmiştir [153, 163]. XRD grafiğinde görülen geniş HAp pikleri, elde edilen kompozit yapılarıdaki apatitin düşük kristaliniteye sahip olduğunu, yani kaplamanın kemik benzeri apatit yapıda olduğunu göstermektedir [164].

XRD verileri incelendiğinde, her iki kompozit doku iskelesi için de yapılan kaplamanın yeterli olduğu belirlenmiştir.

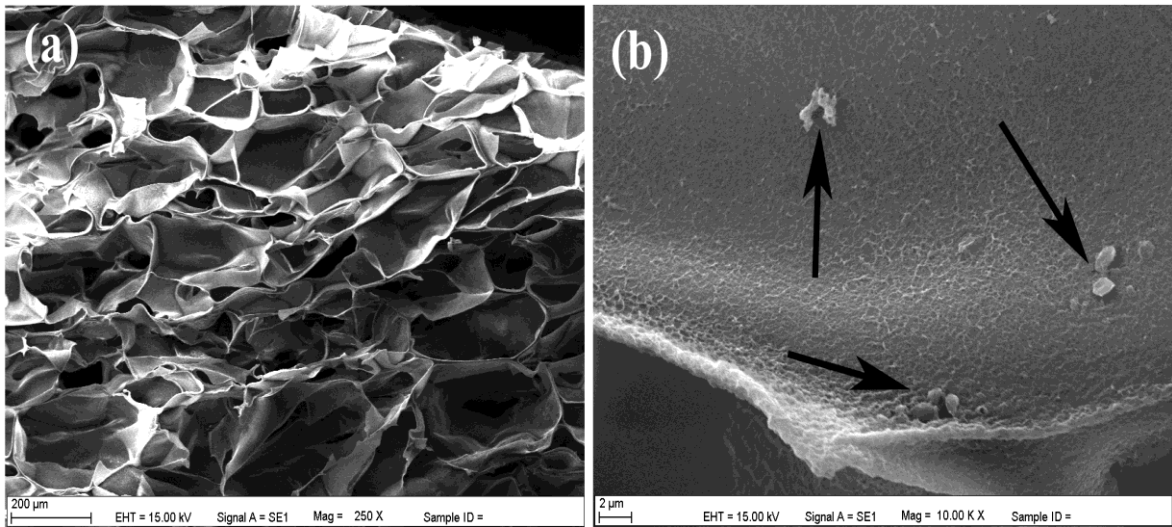
4.2.2.3. SEM analizi

Tez kapsamında üretilen kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri alınan SEM görüntüleri ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.13'te dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen kitosan doku iskelesinin içsel bağlantılara sahip makro gözenekli yapıda olduğu gösterilmektedir.



Şekil 4.13. Dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen kitosan doku iskelesinin farklı büyütme (a) x130, (b) x 500 ait SEM görüntüleri.

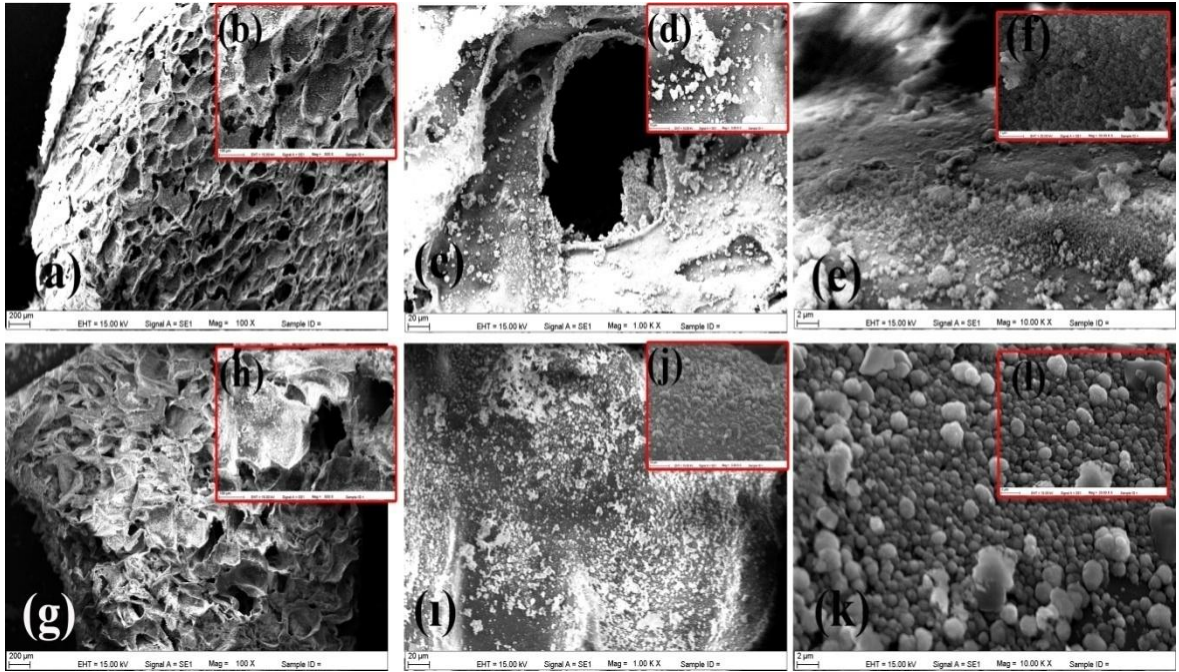
Hazırlanan 10xSBF ve bor katkılı 10xSBF (B-SBF) içerisinde mikrodalga yardımıyla gerçekleştirilen 1 kez kaplamada yeterli mineral faz oluşturulamamıştır (Şekil 4.14a). Ancak etkin bir kaplamanın gerçekleşmesi için gerekli HAp çekirdeklenme bölgeleri (Şekil 4.14b) meydana gelmiştir. Her kaplamada taze SBF kullanılarak yapılan 4 kaplama sonucunda, çekirdeklenme bölgelerine kalsiyum ve fosfat iyonları yığılarak, HAp yapının büyümesi sağlanmıştır.



Şekil 4.14. Mikrodalga yardımıyla SBF içinde 1 kez kaplanan HAp/kitosan doku iskelesine ait SEM görüntüleri (a) 250 X, (b) 10,000 X.

Şekil 4.15'te 4 kez kaplama ile elde edilen HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan'a ait farklı büyütme SEM görüntüleri verilmiştir. Her iki doku iskelesinde de yüzeyin tamamen apatit yapı ile kaplandığı ve elde edilen kaplamanın homojen

olduğu dikkat çekmektedir. SBF ile yapılan kaplamalarda genellikle karnabahar benzeri morfolojiye sahip apatit oluşumu gerçekleşmektedir [165]. TEM görüntüleri incelendiğinde iğne benzeri ya da çubuk benzeri morfolojiye sahip olan apatit yapılarının, kitosan üzerindeki kaplamada daha çok nano küre şeklini aldığı görülmektedir. Oluşan hidroksiapatit yapılarının boyutları ve boy dağılımı SEM fotoğrafları kullanılarak Image J programı ile belirlenmiştir. HAp kristallerinin bir araya gelerek oluşturduğu kümelerin çapları 5,000 X büyütmede incelendiğinde ortalama 1.740 ± 0.389 μm çaplarında oldukları [133], B-HAp kristallerinin oluşturduğu kümelerin çaplarının ise (10,000x büyütmede incelendiğinde) ortalama 0.840 ± 0.119 μm olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15). Sonuçlar değerlendirildiğinde bor katkısının hidroksiapatit kristal kümelerinin çapının küçülmesine neden olduğu ve yapılan kaplamada büyük kümeler yerine daha homojen ve ince bir kaplamanın elde edildiği gözlenmiştir.

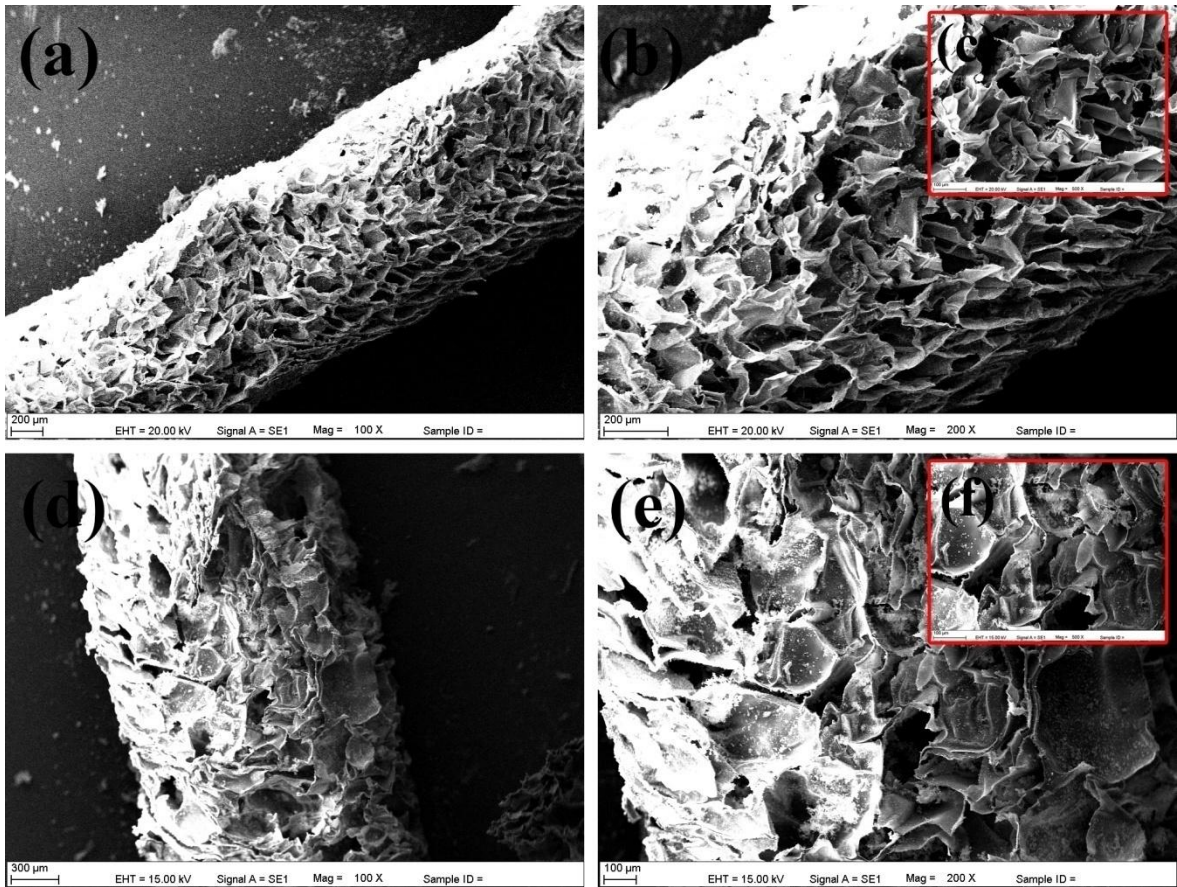


Şekil 4.15. Mikrodalga yardımıyla 10xSBF'de 4 kez kaplama yapılmış doku iskelelerine ait SEM görüntüleri: HAp/kitosan (a)100x, (b)500x, (c)1,000x (d)5,000x, (e)10,000x, (f)50,000x, B-HAp/kitosan (g)100x, (h)500x (i)1,000x, (j)5,000x, (k)10,000x, (l)20,000x.

Doku iskelelerinin üç boyutlu ve gözenekli yapısının nedeniyle SBF ile kaplama sırasında gözeneklerin yeterince kaplanamaması karşılaşılan önemli problemlerden biridir. Çeşitli kemik hasarlarının tedavisinde ihtiyaç duyulan, farklı kemik idame malzemelerinde mineralizasyonun sağlanması ise oldukça önemlidir

[166]. Bu sorunun üstesinden gelmek için, tez çalışmasında hazırlanan doku iskeleleri, kaplama öncesi SBF ya da B-SBF içerisine daldırılarak vakum altında gözeneklerdeki havanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Böylece gözeneklerin de tamamen çözelti ile dolması ve gözenekler SBF çözeltisi ile etkileşirken uygulanan mikrodalga sayesinde bütün yüzeylerin kaplanması sağlanmıştır. Hücre kültürü için 2mmx9mm boyutlarında hazırlanan kompozit iskelelere ait yan kesitler incelendiğinde hem HAp/kitosan (Şekil 4.16a, b ve c), hem de B-HAp/kitosan (Şekil 4.16d, e ve f) doku iskelesinde kaplama derinliğinin yeterli olduğu ve gözeneklerin tamamen kaplandığı, ancak üst yüzeylerdeki kaplamanın daha fazla olduğu görülmektedir.

Kaplama yüzeylerinden SEM-EDX analizleri sonucu yapılan hesaplamalarda HAp/kitosan doku iskelesinin Ca/P molce oranı 2.17 ± 0.37 ve B-HAp/kitosan doku iskelesinin Ca/P molce oranı 2.19 ± 0.26 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar yığın haldeki apatitler ile yapılan EDX analiz sonuçları ile uyumludur.



Şekil 4.16. Kompozit doku iskelelerinin yan kesitlerine ait SEM görüntüleri: HAp/kitosan (a) 100x, (b) 200x, (c) 500x ve B-HAp/kitosan (d) 100x, (e) 200x, (f) 500x.

4.2.2.4. Şişme çalışmaları

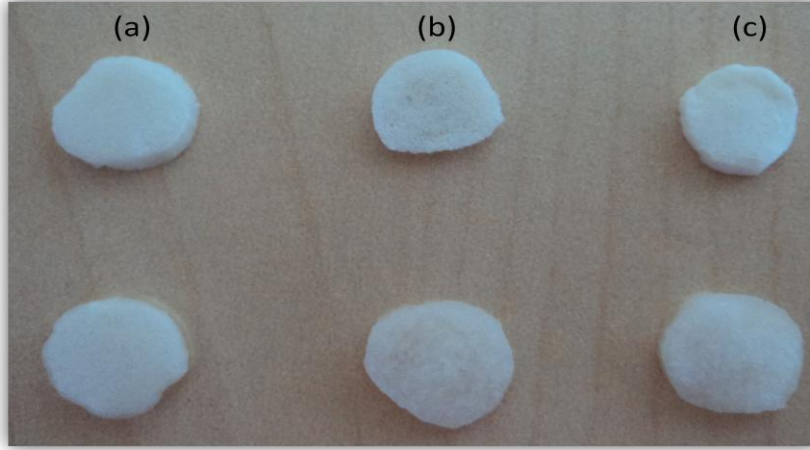
Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelelerinin 37°C'de PBS içerisinde (pH=7.4) 3 paralel örnek ile gerçekleştirilen şişme testlerinin sonucunda elde edilen denge şişme oranları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Tez kapsamında üretilen doku iskelelerinin şişme karakteristikleri.

Doku iskelesi	Denge Şişme Oranı
Kitosan	34.90±1.90
HAp/kitosan	33.19±1.73
B-HAp/kitosan	28.91±1.41

Denge şişme oranları incelendiğinde, kompozit doku iskelelerinden HAp/kitosan doku iskelesinin şişme oranının kitosan doku iskelesine benzer olduğu, ancak B-HAp/kitosan doku iskelesinin şişme oranının kitosan doku iskelesine göre yaklaşık olarak %20 daha az olduğu belirlenmiştir. Denge şişme oranının azalmasında, hidroksiapatit kristallerine (40-50 nm) göre daha küçük çaplarda oluşan bor katkılı hidroksiapatit kristalleriyle (20-30 nm), kitosan doku iskelesinde daha homojen ve sıkı bir kaplama yapılabilmesinin (Şekil 4.15 e ve k) etkisi olduğu düşünülmüştür.

Doku iskelelerinin kuru ve şişme sonrası görüntüleri ise Şekil 4.17'de verilmiştir. Genel görüntülerine bakıldığında, şişme sonrasında yapı bütünlüğünde herhangi bir bozulma olmadığı ancak şişmeye bağlı olarak tüm örneklerde hacim artışı olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 4.17. Kitosan ve kompozit doku iskelelerinin kuru halde (üst sıra) ve şişme sonrası (alt sıra) görüntüleri: kitosan (a), HAp/kitosan (b), B-HAp/kitosan (c).

4.2.2.5. Gözenekliliğin belirlenmesi

Çalışma kapsamında üretilen doku iskelelerinin gözeneklilikleri Bölüm 3.3.2.5’de açıklanan Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.7’de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Doku iskelelerinin yüzde gözeneklilik değerleri.

Doku iskelesi	Gözeneklilik (%)
Kitosan	89.5±1.03
HAp/kitosan	81.9±0.76
B-HAp/kitosan	85.7±2.57

Gözeneklilik değerleri incelendiğinde en yüksek gözenekliliğin kitosan iskeleye ait olduğu görülmektedir. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskelelerin gözenekliliği ise kitosana göre daha düşüktür. Ancak kompozit iskeleler kendi aralarında karşılaştırıldığında B-HAp/kitosan iskelenin gözenekliliğinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu farkın, B-HAp/kitosan kaplamanın yapısındaki apatitin daha küçük kristallerden oluşması nedeniyle olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece gözenekler daha az kapanmış ve gözeneklilik daha az etkilenmiştir. Yüksek gözenek hacmi ve boyutuna sahip iskelelerde deformasyona uğrayacak alan büyüdüğünden, kompozit yapılarda gözenekliliğin bir miktar azalması mekanik dayanımın artmasına neden olmaktadır.

Genel olarak tüm iskeleler değerlendirildiğinde, %80 ve üzeri gözenekliliğin iskele içine hücre penetrasyonu ve aynı zamanda besin ve metabolit için gerekli olan kütle aktarımını sağlayabilecek özellikte olduğu belirlenmiştir. Yüksek oranda gözenekli yapılar, doku mühendisliği çalışmaları için istenen özellikte malzemelerdir ve ortamda bulunan besinmaddelerine ulaşım açısından uygun oldukları ortaya konmuştur [167].

4.3. Hücre Kültür Çalışmaları

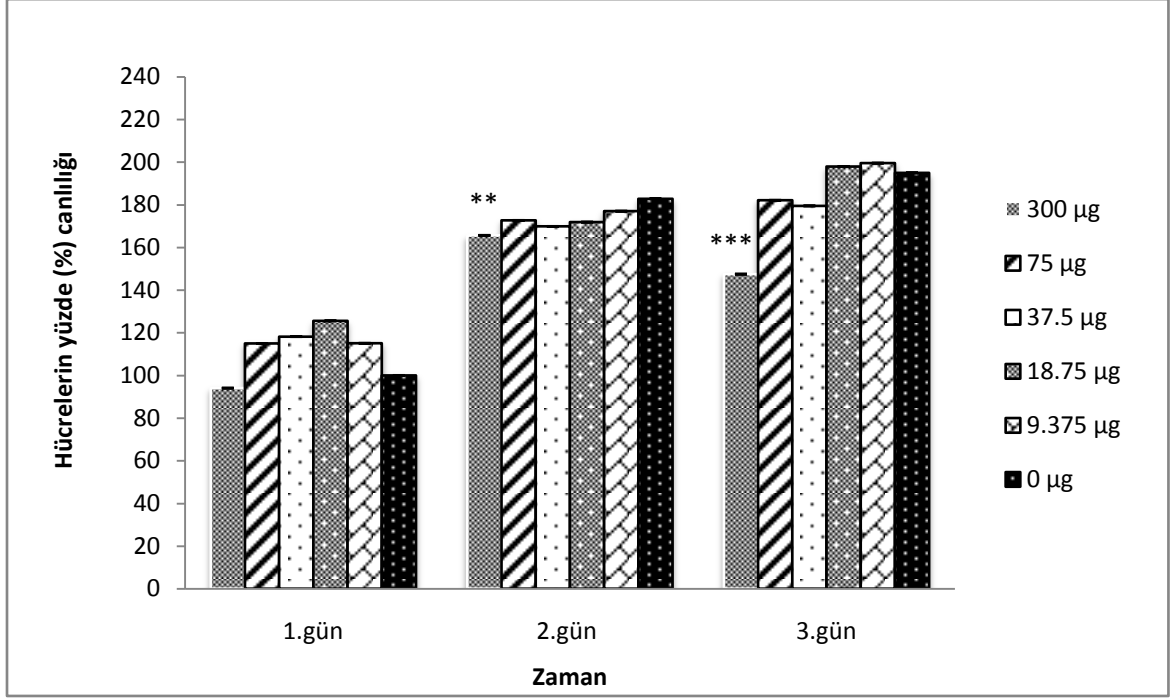
Tez kapsamında sentezlenen kitosan, HAp kaplama kitosan ve B-HAp kaplama doku iskeleleri kullanılarak, preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı ile 21 gün boyunca durgun koşullarda hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

Kültür süresince yapılan analizler ile preosteoblastik hücrelerin hazırlanan doku iskeleleri üzerindeki canlılıkları, morfolojileri ve osteoblastik farklılaşmaları incelenmiştir ve bor katkılı hidroksiapatit kaplama iskelenin farklılaşmaya etkisi diğer iskeleler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Hücreler üzerine borun herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığını değerlendirmesi amacıyla da L929 fare fibroblastı hücre hattı ile sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır.

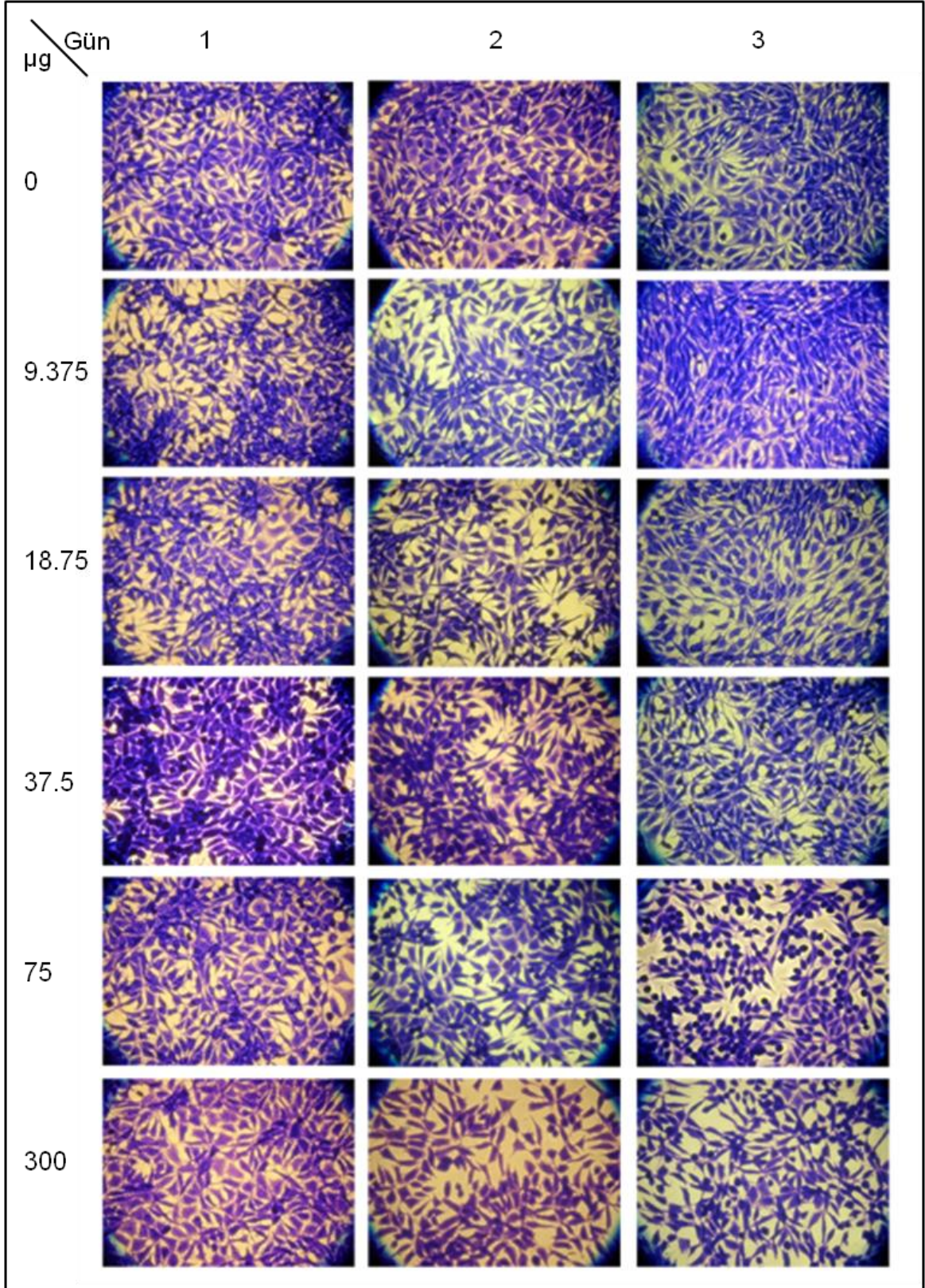
4.3.1. L929 fibroblast hücre hattı ile yapılan sitotoksosite çalışmaları

Bor katkılı hidroksiapatitin yapısına katılan bor miktarının herhangi bir toksik etkisi olup olmadığının değerlendirilmesi açısından öncelikle HÜKÜK hücre bankasından sağlanan L929 fibroblast hücre hattı ile sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla hücre ekimi gerçekleştirildikten 24 sa sonra (5×10^4 hücre/mL) kültür ortamına stok borik asit çözeltisinden belirtilen konsantrasyonlarda bor içerecek şekilde eklenmiş ve hücre proliferasyonu 3 gün boyunca MTT testi ile takip edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Kültür ortamlarına farklı konsantrasyonlarda bor eklenen L929 hücrelerine ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu 0 µg iken* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Kültür ortamına bor (0 µg) eklenmeyen grup, kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunun ilk gün absorbans değerleri %100 olarak kabul edilmiş ve diğer grupların değerleri kontrol grubuna oranlanarak, zamana karşı yüzde canlılık grafiği elde edilmiştir. İlk gün verileri incelendiğinde, gruplar arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. İkinci günde, tüm gruplar için hücre canlılığı artış göstermiştir. Ancak 300 µg/mL bor eklenen grupta hücre canlılığı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı dercede daha azdır (p<0.01). MTT testinin 3. gününde 300 µg/mL bor eklenen grupta anlamlı şekilde hücre canlılığı azalırken (p<0.001), diğer gruplarda, kontrol grubu ile benzer şekilde, hücre sayısı artmaya devam etmektedir. Kaplama çalışmaları sonrasında yapılan gravimetrik analizler ile B-HAp/kitosan doku iskelelerinde kaplamadan kaynaklanan borunyaklaşık 20µg olduğu hesaplanmıştır. Sitotoksosite çalışmalarıyla elde edilen veriler doğrultusunda, bu değer non-toksik olarak tanımlanmış ve üretilen B-HAp/kitosan doku iskelelerinin hücre kültürü çalışmaları için uygun olduğu görülmüştür.

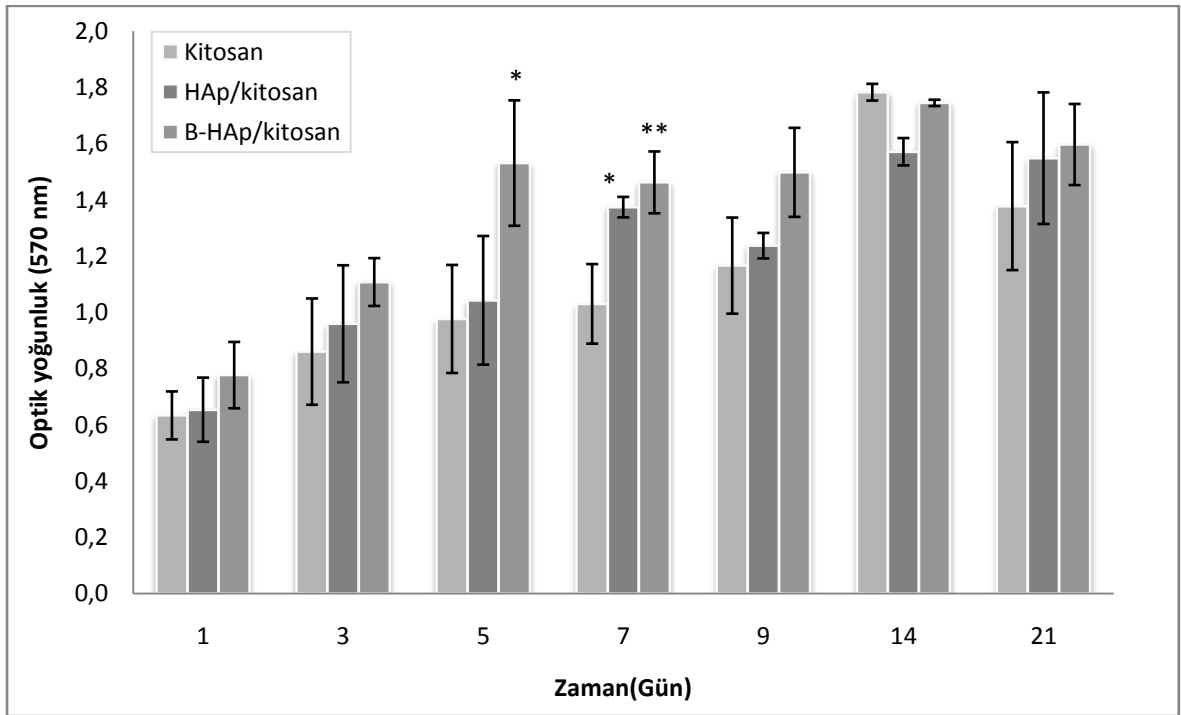


Şekil 4.19. Farklı bor konsantrasyonları eklenen kültür ortamlarında üreyen L929 hücrelerine ait kristal viyole boyama görüntüleri (Olympus IX71, 20x).

Sitotoksosite çalışmaları kapsamında, hücre canlılığının yanında, hücre morfolojisinin takibi için kristal viyole boyamaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.19). Işık mikroskobu altında yapılan gözlemler sonucunda, farklı bor konsantrasyonu kullanılan gruplar ile kontrol grubunun karşılaştırılmalı fotoğrafları elde edilmiştir. 3. gün boyunca yapılan gözlemlerde, hücrelerin kültür kabının yüzeyine sağlıklı bir şekilde yapıştıkları ve yayıldıkları belirlenmiştir. MTT sonuçları ile uyumlu olarak, 300 µg/mL bor konsantrasyonu eklenen grupta 3. gün hücre yoğunluğunda azalma gözlenirken, diğer gruplarda hücre yoğunluğunun gün geçtikçe arttığı belirlenmiştir. Ayrıca tüm gruplarda hücrelerin fibroblastik görüntü sergiledikleri ve çekirdek bütünlüklerini korudukları tespit edilmiştir. Yaklaşık 20 µg/iskele bor değerinin, hücre üremesi yanında hücre morfolojisi üzerinde de olumsuz bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

4.3.2. MTT analizi

Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskelelerdeki hücre üremesi, 21 günlük inkübasyon periyodunda Bölüm 3.4.3'te açıklanan mitokondriyal aktivite tayin testi (MTT testi) kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Doku iskeleleri ile yapılan çalışmalarda hücre canlılığının belirlenmesi amacı ile yapılan MTT testi incelendiğinde her üç iskeleninde hücrelerin tutunup çoğalmasına uygun olduğu görülmektedir. Kültürün ilk 3 gününde, gruplar arasında, hücre canlılığı açısından, anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Kültürün 5. gününde B-HAp/kitosan grubunda en yüksek hücre canlılığına ulaşılmıştır ($p<0.05$). 7. gün MTT değerleri incelendiğinde ise HAp/kitosan ($p<0.05$) ve B-HAp/kitosan ($p<0.01$) doku iskelelerinde hücre canlılığının, kitosan ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak fazla olduğu ve en yüksek hücre canlılığının B-HAp/kitosan grubunda olduğu belirlenmiştir. 14. ve 21. günlerde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Genel olarak MTT verileri incelendiğinde, her üç grupta da hücre üremesinin logaritmik olarak arttığı ve 14. günde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür.

Aday ve Gümüşderelioğlu'nun[106]MC3T3-E1 hücreleri ile yaptığı çalışmada biyomimetik yöntem ile HAp kaplanan kitosan iskeledeki üreme hızlarının ilk 10 günde, kitosan iskeleye göre çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Biyomimetik yöntem ile elde edilen HAp kaplamanın iskelenin osteoindüktif ve osteokondüktif özelliğini arttırdığı, ayrıca serum proteinlerinin HAp etkisi ile iskele yüzeyine daha iyi tutunduğu ifade edilmiştir.

Ying ve ark. [89]1-1000 ng/mL arasında değişen farklı bor konsantrasyonlarının insan kemik iliği kök hücrelerinin çoğalmasına etkisini incelemişlerdir. Ancak 14. güne kadar hiçbir grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yalnızca 1000 ng/mL borik asit uygulanan grupta 4. günden itibaren hücre çoğalmasının hızı diğer gruplara oranla yavaşlamıştır. Borun MC3T3-E1 hücre hattı proliferasyonuna olan etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, 24. saatin sonunda yapılan MTT analizleri sonucunda 1000-10000 ng/mL konsantrasyon bor ilave edilen gruplarda hücre canlılığının azaldığı ancak 72. saatin sonunda bu etkinin ortadan kaybolduğu belirlenmiştir. Borun MC3T3-E1 hücreleri üzerine doğrudan bir toksik etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır[15]. Borun hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, 10-20 µg/mL arasında değişen sodyum pentaborat pentahidrat (NaB) konsantrasyonlarının, insan diş pulpası kök hücrelerinin canlılığını arttırdığı belirlenmiştir[138].

4.3.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Tez kapsamında üretilen 3 farklı doku iskelesine ait SEM görüntüleri ile iskelelerin hücre-malzeme etkileşimleri ve biyouyumluluk açısından uygun malzemeler olup olmadıkları değerlendirilmiştir.

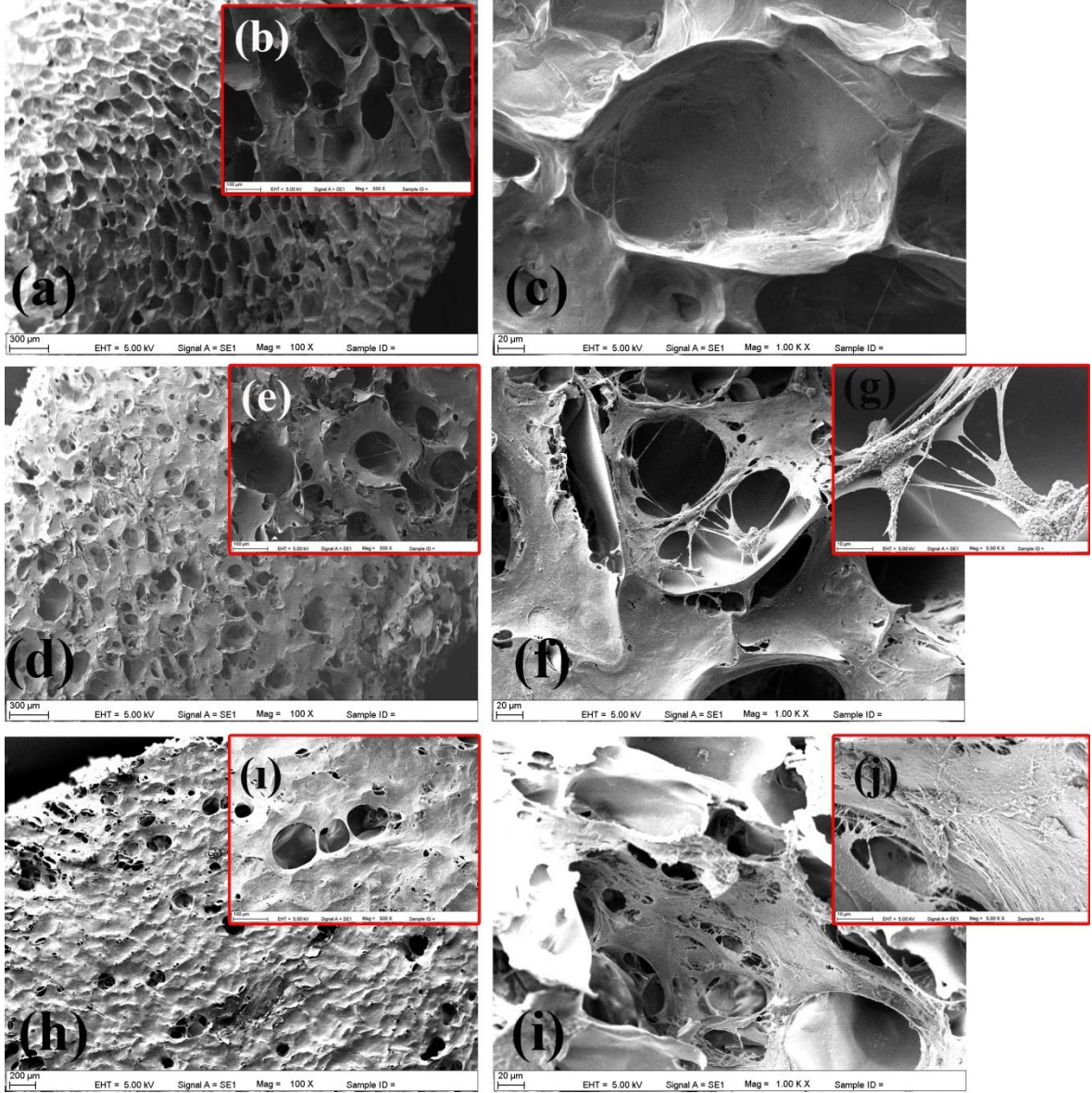
Kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin, kültürün 4. ve 7.ve 14.gününe ait morfolojileri Şekil 4.21'de verilmiştir. Hücrelerin iskeleye tutundukları, yayıldıkları ve içsel bağlantılı gözeneklere doğru göç ettikleri Şekil 4.21a,b ve c' de açıkça görülmektedir. 7.günden itibaren ise hücre çoğalmasının hızla arttığı (Şekil 4.21 d ve e) ve 14 günde hücrelerin ve ürettikleri hücre dışı matrisin iskele gözeneklerini neredeyse tamamen kapattıkları gözlenmiştir (4.21 h ve ı) ve ayrıca Şekil 4.21 g ve h'de görüldüğü gibi hücreler gözenekler içinde sitoplazmik uzantıları aracılığı birbirleriyle bağlantı kurmuşlar ve üç boyutlu bir çoğalma sergilemişlerdir.

HAp/kitosanüzerinde yayılıp çoğalan hücrelerin 4., 7. ve 14. gün görüntüleri sırasıyla Şekil 4.22 a-e, Şekil 4.22 f-i ve Şekil 4.22 j-n'de verilmiştir. Yüzeyde bulunan HAp kaplamalar ile hücrelerin etkileşimi Şekil 4.22 d ve e'de açıkça görülmektedir. Kompozit yapıda bulunan kaplamalar hücreler ve hücre dışı matrisler arasından görülmektedir. Bu da yapılan kaplamanın kararlılığının bir göstergesidir. Yüzeydeki HAp kaplamasının hücre tutunmasına ya da çoğalmasına herhangi bir olumsuz etkisinin olmamasının yanında, Chen ve ark. [168] yaptıkları çalışmada nanotopografik detaylar ile artan yüzeypürüzlülüğünün, yüzey alanını arttırdığını ve böylece hücreler için daha fazla bağlanmaalanı oluşturduğunu belirtmişlerdir.

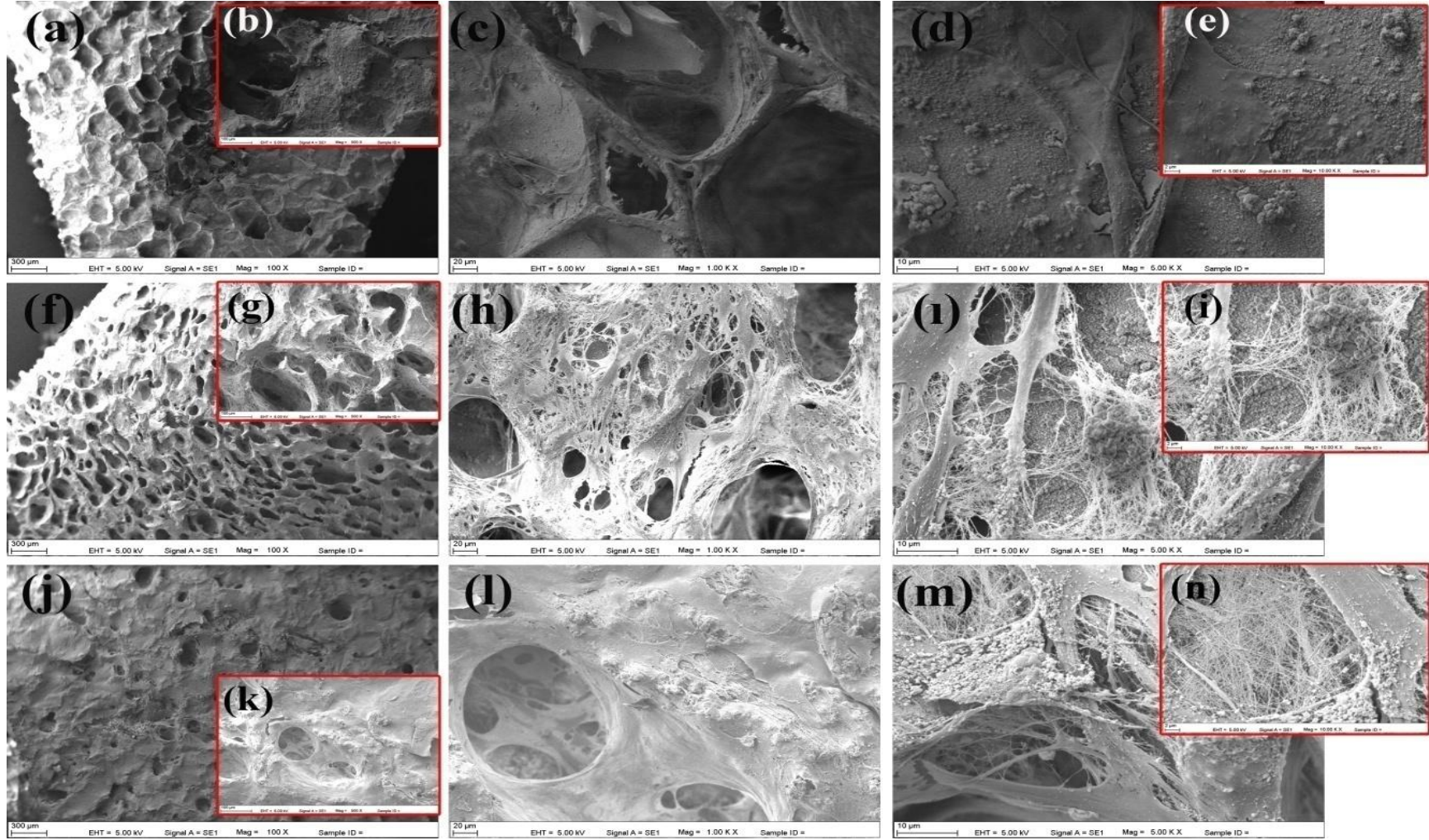
HAp ile hem kimyasal hem de fiziksel olarak etkileşime giren hücreler sitoplazmik uzantıları ile apatitlere doğru yönelmektedirler. Böylece hücreler HAp'nin osteoindüktif ve osteokondüktif etkisiyle farklılaşmaya doğru gitmektedirler. Kitosan doku iskelelerinde görülmeyen mineral kümeleri ve kollajen fiberler HAp/kitosan iskelede 7 ve 14. günlerde belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 4.22 h-i ve Şekil 4.22 m, n).

14.gün SEM görüntüleri (Şekil 4.22 j) incelendiğinde ise MTT verileri ile uyumlu şekilde hücrelerin çok fazla üremesiyle iskele yüzeyini tamamen kapladıkları gözlenmiştir. Hücrelerin yoğun bir şekilde hücre dışı matris sentezledikleri ve nano

boyutta kollajen fiberler ürettikleri Şekil 4.22 n'de detaylı şekilde gösterilmektedir. Ayrıca hücre membranlarının üzerindeki mineral birikimlerinin 14. günde dahada büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.22 l ve m). Bu sonuçlar ile HAp/kitosan iskelelerin, MC3T3-E1 hücrelerinin tutunmasını, yayılmasını, üremesini ve osteoblastik farklılaşmasını desteklediği belirlenmiştir.

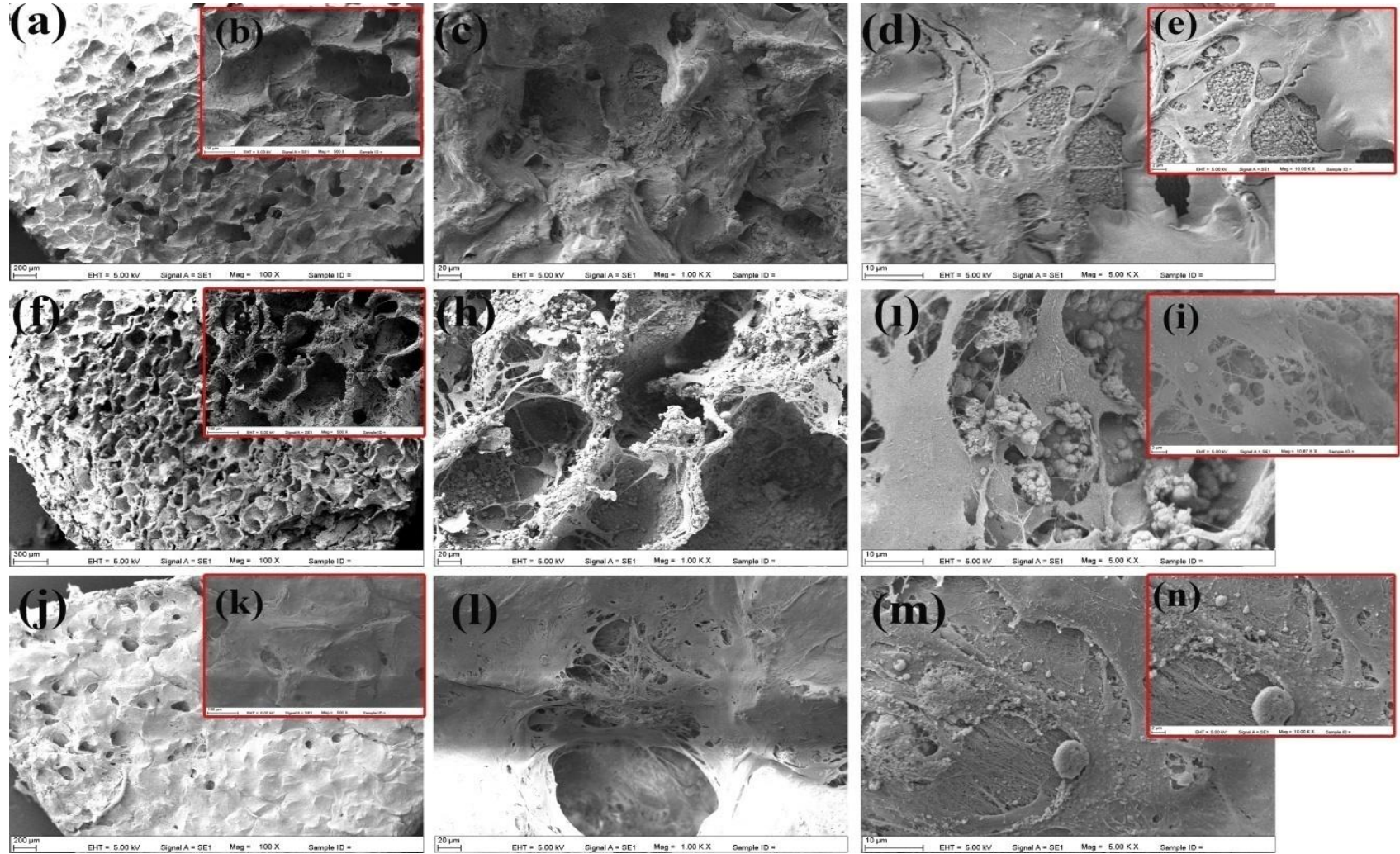


Şekil 4.21. Kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: 4. gün (a) 100X, (b) 500x, (c) 1,000x, 7.gün (d) 100x, (e) 500x, (f) 1,000x, (g) 5,000x, 14.gün (h) 100x, (i) 500x, (i) 1,000x, (j) 5,000x.



Şekil 4.22. HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: 4. gün (a) 100x, (b) 500x, (c) 1,000x, (d) 5,000x, (e) 10,000x, 7.gün (f) 100x, (g) 500x, (h) 1,000x, (i) 5,000x, (j) 10,000x, 14.gün (j) 100x, (k) 500x, (l) 1,000x, (m) 5,000x, (n) 10,000x.

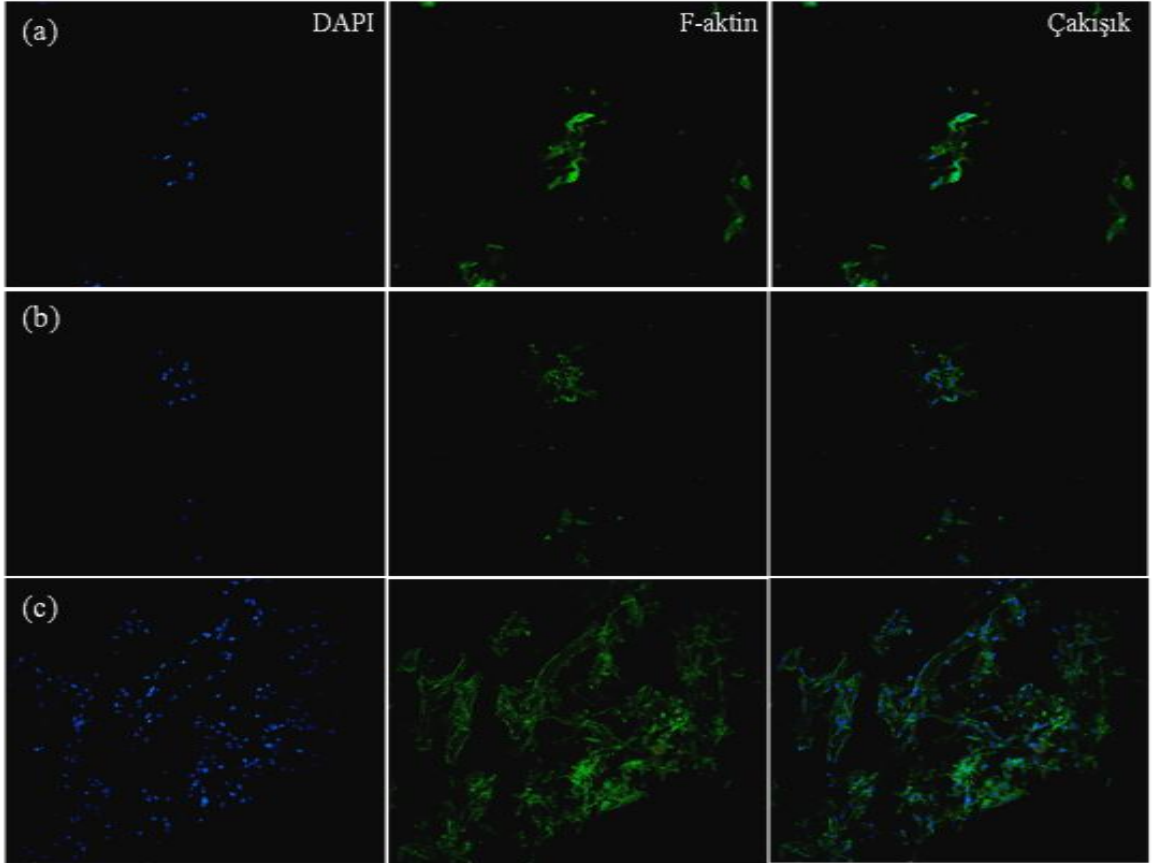
B-HAp/kitosan iskelelerinin sırasıyla 4.,7 ve 14. günlere ait SEM görüntüleri incelendiğinde, doku iskelesinde hücre yoğunluğunun arttığı Şekil 4.23 a, f ve j ile gösterilmektedir. B-HAp kaplı yüzeylerde hücrelerin tutunup yayıldıkları ve bu morfoloji üzerinde 4.günden itibaren hücreler arası iletişim kurabildikleri görülmüştür (Şekil 4.23d). Elde edilen MTT analiz sonuçları ve SEM görüntüleri değerlendirildiğinde, hidroksiapatit yapısına biyomimetik yöntem ile katılmış olan borun herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı, hatta diğer gruplara göre hücre yapışması ve çoğalmasını daha iyi desteklediği görülmüştür. Bu etkinin nedeninin, yapı içine katılan borun ya da borat iyonlarının, apatitin kafes yapısını değiştirmesi olabileceği gibi, asıl etkinin kemik benzeri apatitten gerçekleşen bor iyonları salımından kaynaklanan osteoindüktif etkiye bağlı olabileceği de düşünülmektedir.



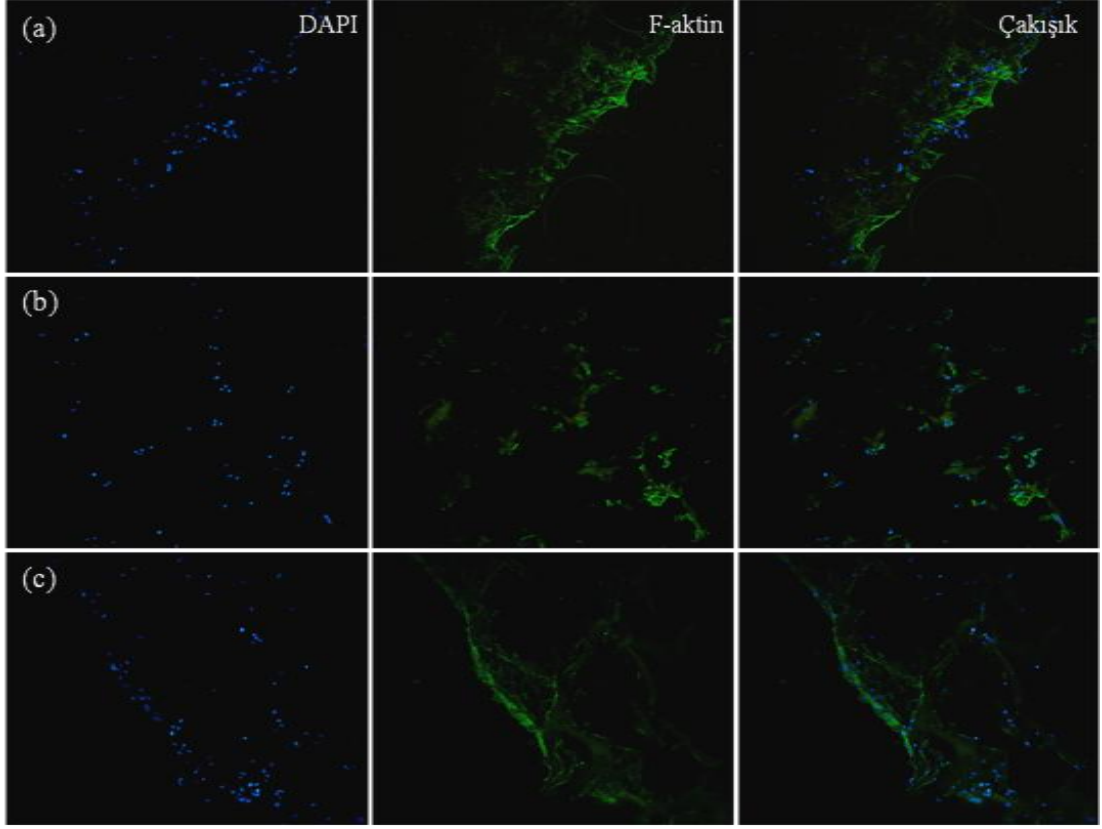
Şekil 4.23. B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: 4. gün (a) 100x, (b) 500x, (c) 1,000x, (d) 5,000x, (e) 10,000x, 7.gün (f) 100x, (g) 500x, (h) 1,000x, (i) 5,000x, (j) 10,870x, 14.gün (j) 100x, (k) 500x, (l) 1,000x, (m) 5,000x, (n) 10,000x.

4.3.4. İmmunohistokimyasal boyama

Hücre kültürünün 7. ve 21. günlerinde hücre morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla, immünohistolojik analizler yapılmıştır. Hücre çekirdekleri DAPI boyaması ile mavi, hücre sitoplazmasındaki F-aktin fiber yapıları ise Alexafluor 488 Phalloidin konjuge anti-Faktin antikoru ile yeşil renkte görülmektedir. 7. günde yapılan boyamalar incelendiğinde, SEM ve MTT analizlerini destekler nitelikte, B-HAp/kitosan doku iskelelerinde hücrelerin diğer iskelelere göre daha fazla ürediği ve hücreler arası organizasyonun daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.24). 21. gün boyamalarına bakıldığında ise, tüm iskelelerde hücrelerin ürediği ve hücre sayısının arttığı görülmektedir (Şekil 4.25).



Şekil 4.24. Kitosan(a), HAp/kitosan(b), B-HAp/kitosan (c) iskelelerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 7 günlük inkübasyon sonrası anti-Faktin antikoru (yeşil) ve DAPI (mavi) ile immünofloresan boyamaları (20x).



Şekil 4.25. Kitosan (a), HAp/kitosan(b), B-HAp/kitosan (c) iskelelerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 21 günlük inkübasyon sonrası anti-Faktin antikoru (yeşil) ve DAPI(mavi) ile immünofloresan boyamaları(20x).

4.3.5. RT-PCR analizleri

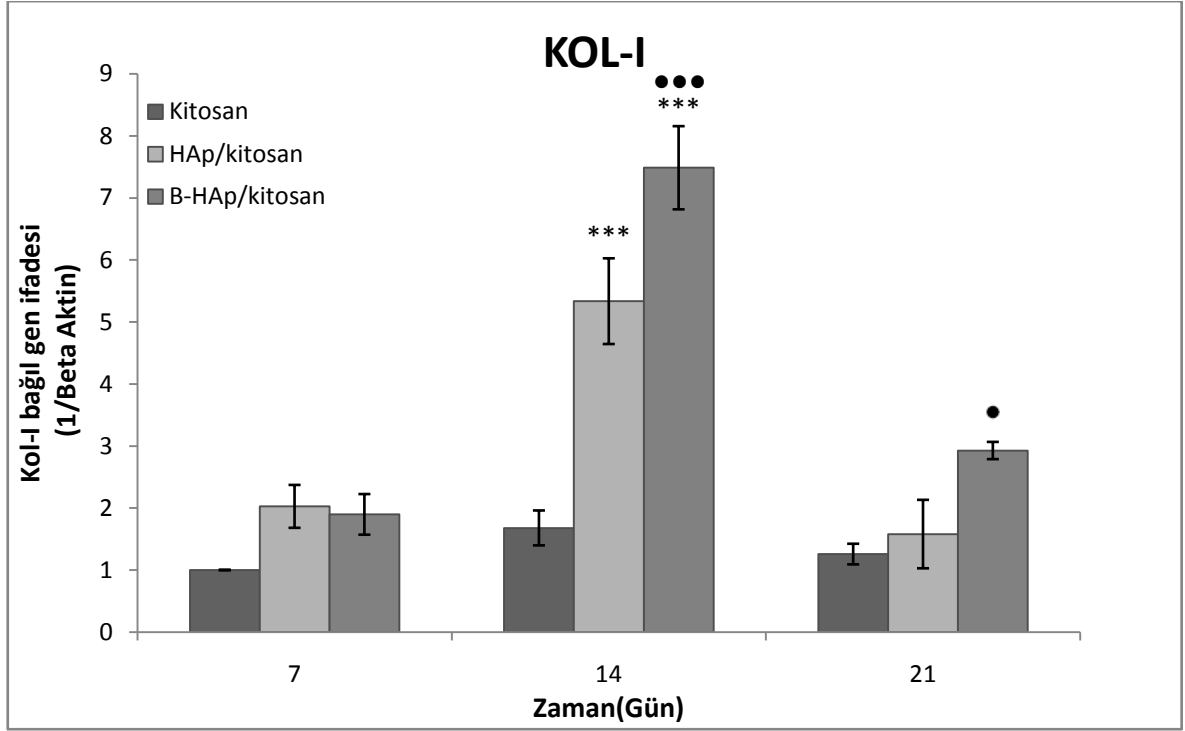
Gerçek zamanlı kantitatif PCR(Real-time PCR) nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, klasik PCR'da ihtiyaç duyulan elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir.

Çift zincirli (ds) DNA'ya bağlandıkları zaman floresan ışımaya veren SYBR-Green I gibi boyalar kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı, floresan miktarı ile ölçülmektedir. RNA ekstraksiyonu yapılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizlerinde öncelikle komplementer DNA (cDNA) sentezlenmesi gerekmektedir. Ters transkriptaz (Revers Transcriptase) enzimi ile mRNA'nın kalıbı oluşturularak elde edilen cDNA doğrudan PCR işleminde kullanılmaktadır.

Analizin gerçekleştirilebilmesi ve DNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında şu bileşenlerin bulunması gereklidir: 1) çoğaltılacak olan kalıp DNA, 2) kalıp DNA'da çoğaltılması planlanan bölgedeki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan primerler, 3) enzim olarak Taq Polimeraz, 4) sentezde kullanılacak deoksinükleotid trifosfatlar ve 5) polimerazın çalışması için uygun pH ve iyon derişimini sağlayacak olan tampon çözeltisi.

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur ve 95°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılır ve DNA tek iplikçik haline gelir. İkinci basamak birleşmedir. Sıcaklığın 50-52°C'ye düşürülmesi ile reverse ve forward primerler, komplementeri olduğu tek iplikçik hedef DNA üzerinde yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Üçüncü basamak polimerizasyon ya da sentez aşamasıdır. Bu aşamada sıcaklık 70-72°C'ye çıkartılarak Taq polimeraz enzimi, 5'-3' yönünde olmak üzere, zincirin 3' ucuna nükleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir.

Sunulan tez çalışması kapsamında, doku iskelelerine ekilen hücrelerin osteojenik farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla hücrelerdeki kollajen-I (KOL-I), RunX2, osteokalsin (OCN) ve osteopontin (OPN) gen ifadeleri RT-PCR ile belirlenmiştir.

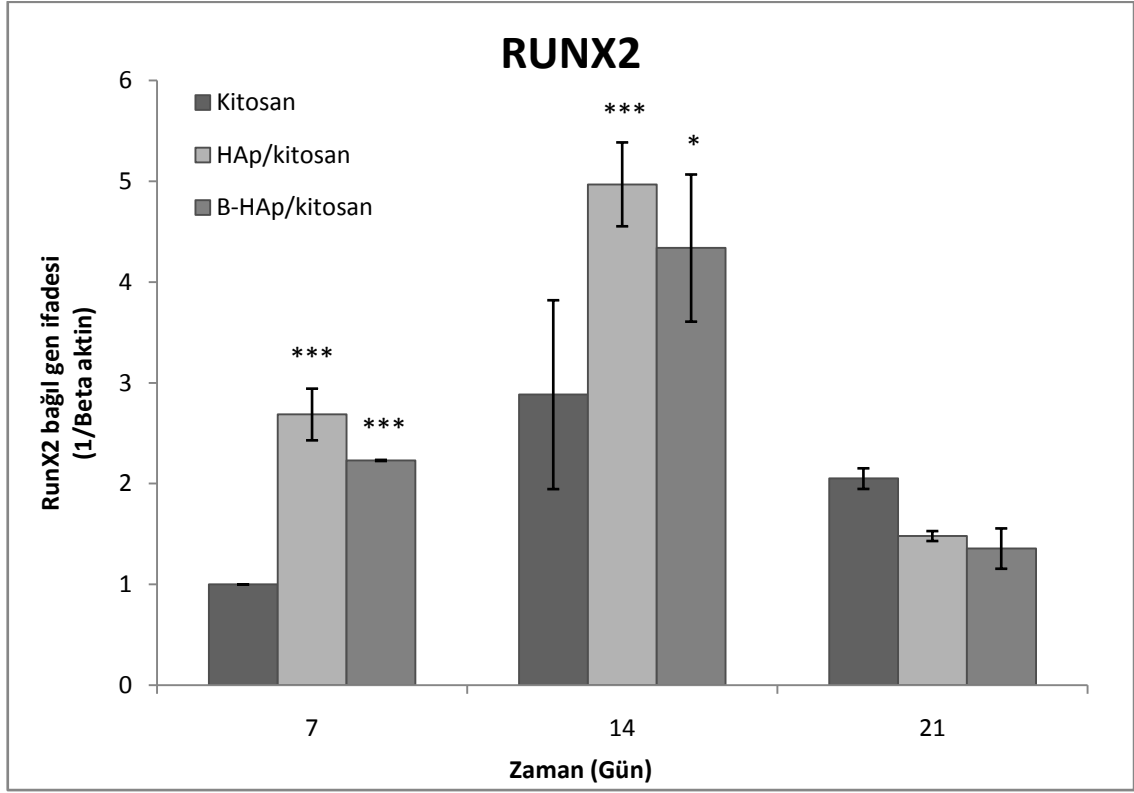


Şekil 4.26. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl kollajen-I gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken, *** p<0.001; kontrol grubu HAp/kitosan iken • p<0.05, ●●● p<0.001).

Yeni kemiğin oluşumu sırasında ilk önce hücre çoğalması gerçekleşmekte ve çoğalan osteoblastlar KOL-I salgılamaktadırlar. Tip I kollajen üretimi osteoblastların farklılaşma ve olgunlaşma döneminde azalmaktadır [169].

İskeleler üzerindeki hücrelerin kollajen-I ekspresyonları incelendiğinde (Şekil 4.26), kitosan iskelede KOL-I seviyesinin güne bağlı olarak herhangi bir artış göstermediği belirlenmiştir. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan gruplarında ise KOL-I ekspresyonu 7. günden 14. güne gelindiğinde anlamlı olarak artmış ve en yüksek değere ulaşmıştır (p<0.001). Ayrıca 14. gün değerleri kendi içinde incelendiğinde, kitosana göre, HAp/kitosan grubunun KOL-I ekspresyonunun yaklaşık 3 kat ve B-HAp/kitosan grubunun kollajen miktarının ise yaklaşık 4.5 kat fazla olduğu görülmüştür (p<0.001). 21. günde KOL-I ekspresyonu tüm gruplarda düşmekle birlikte, B-HAp/kitosan grubundaki ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak diğer gruplardan fazladır (p<0.05). 21. güne gelindiğinde ise HAp ve B-HAp kitosan iskelelerdeki hücrelerin farklılaşmaya doğru yöneldikleri, azalan KOL-I seviyelerinden açıkça anlaşılmaktadır. Yin ve ark. [89] borun insan kemik iliği stroma hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerine yaptıkları

çalışmada ortamlarına 1-1000 ng/mL borik asit ilavesinin, hücrelerin erken farklılaşma belirteci olan KOL-1 gen ifadesini 7. günde kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde arttırdığını belirtmişlerdir.

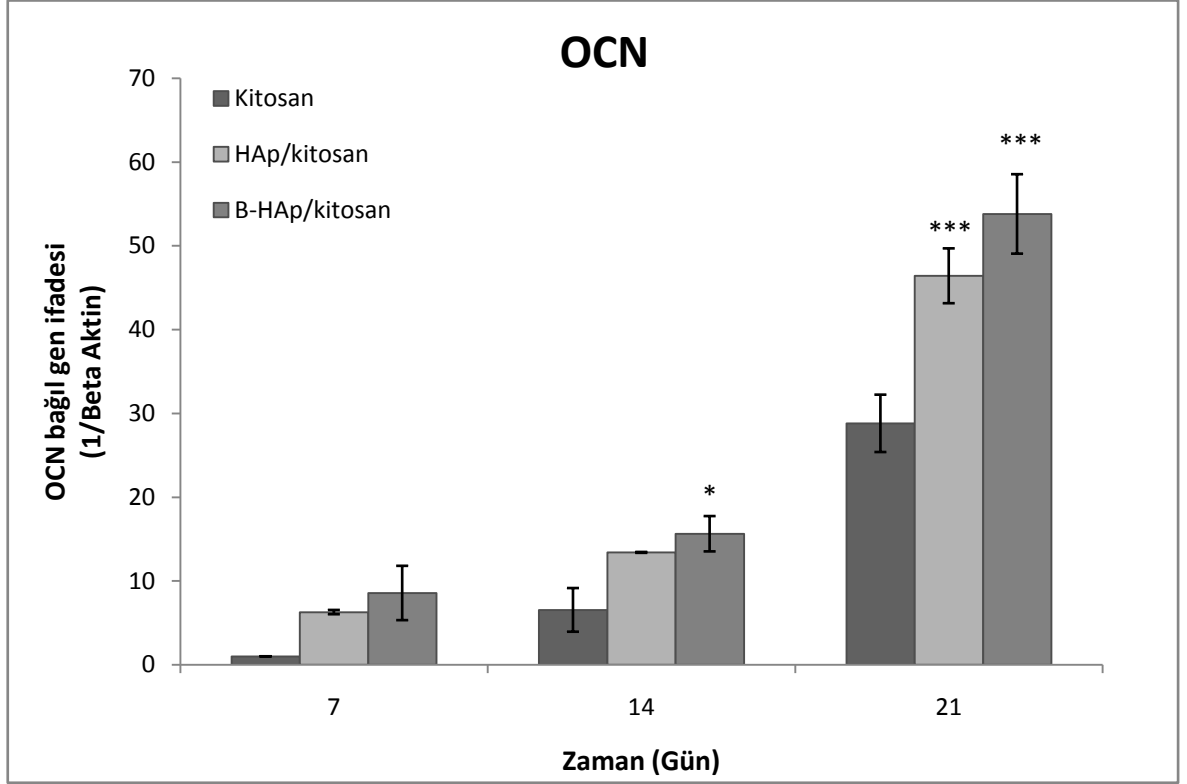


Şekil 4.27. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl RunX2 gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Çalışmada, osteojenik osteoblast farklılaşmasının erken dönemlerinde kemik matris proteinlerinin ekspresyonlarını başlatan RunX2 gen (Komori, 2010) ifadesi incelenmiş (Şekil 4.27) ve 7. günde HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan gruplarında ekspresyon seviyesinin, kitosan ile karşılaştırıldığında, oldukça anlamlı derecede fazla olduğu belirlenmiştir (p<0.001). Tüm gruplar için RunX2 ifadesi 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 14. gün RunX2 ifadeleri kendi içinde değerlendirildiğinde, ekspresyon seviyelerinin kitosana göre, HAp/kitosan grubunda 1.7 kat ve B-HAp/kitosan grubunda da yaklaşık 1.5 kat fazla olduğu belirlenmiştir.

Osteoblast farklılaşmasında temel bir düzenleyici faktör olan RunX2 gen mutasyonuna sahip farelerde kemik dokunun oluşmadığı gözlenmiştir. Olgun osteoblastlarda da aktif olan bu gen osteokalsin, osteopontin ve kollajen-1

seviyelerini de etkilemektedir. Borun 0.1-1000 ng/mL konsantrasyonlarının MC3T3-E1 hücrelerinin RunX2 gen ifadesini arttırdığı bilinmektedir [15]. Wu ve ark. [88] bor içeren gözenekli biyoaktif cam doku iskeleleri üzerindeki osteoblastların, kültürün 7. ve 14. gününde RunX2 gen ifadelerinin arttığını göstermişlerdir. Bu etkinin ise doku iskelesinden salınan bor iyonundan kaynaklandığı öngörülmüştür.

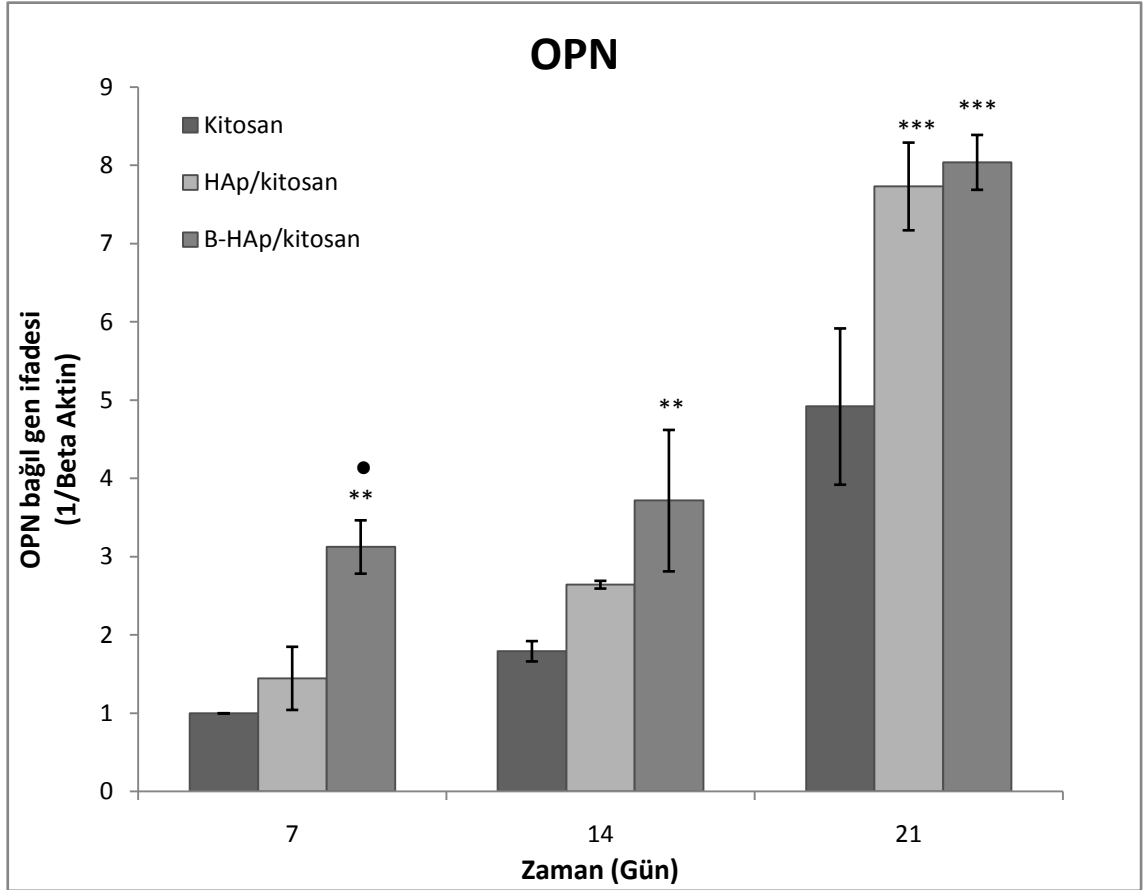


Şekil 4.28. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl osteokalsin gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Olgun osteoblast oluşumunun bir göstergesi olan osteokalsin farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkar. *In vitro* ortamda da durum *in vivo* ortamda olduğu gibidir, hücre çoğalması azalmaya başladığında erken farklılaşma belirteçleri artmaya başlar ve osteokalsin son aşamada üretilir [170].

Osteokalsin ekspresyonları incelendiğinde (Şekil 4.28) tüm gruplarda ekspresyon seviyesinin 7. günden 21. güne logaritmik olarak arttığı ve 21. günde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür. 14. günde B-HAp/kitosan'daki osteokalsin seviyesi diğer gruplara göre anlamlı derecede fazladır (p<0.05). 21. günde HAp/kitosan'daki osteokalsin seviyesi kitosanın 1.6 katı ve

B-HAp/kitosan'daki osteokalsin seviyesi ise kitosanın 1.9 katıdır. B-HAp/kitosan iskelede 21. günde görülen en yüksek osteokalsin seviyesi farklılaşma ve mineralizasyonun desteklendiğinin göstergesidir. Bu sonuçlar SEM görüntülerindeki mineralize yapılarla da desteklenmektedir. Grausova ve ark. [171] 6700 ppm'e kadar bor ile katkıladıkları elmas filmlerin üzerinde MG 63 osteoblast benzeri hücreler ile yaptıkları kültür çalışmalarında, filmlerin bor katkısı artıkça hücrelerin osteokalsin gen ifadelerinin arttığını belirlemişlerdir.



Şekil 4.29. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl osteopontin gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, kontrol grubu HAp/kitosan iken • p<0.05, ●●● p<0.001).

Osteopontin kemiğin şekillendirilmesinde görev alan önemli bir aracı proteindir. Ostejenik farklılaşmanın geç dönemlerinde mineralizasyonu inhibe ederek negatif bir regülatör olarak görev yapar [172].

Osteopontin ekspresyonları incelendiğinde (Şekil 4.29), 7. günde en yüksek ekspresyon seviyesi B-HAp/kitosan grubunda görülmüştür. Tüm gruplarda

osteopontin ekspresyonu güne bağlı olarak artış göstermiştir. 14. günde B-HAp/kitosan grubundaki OPN ekspresyonu kitosanın yaklaşık 2 katı ve HAp/kitosan'ın yaklaşık 1.4 katıdır. 21. gün OPN ekspresyonu HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan'da, kitosana göre anlamlı derecede fazladır ($p<0.001$).

Hakkı ve ark.[15] 0-1000 ng/mL bor konsantrasyonu uyguladıkları MC3T3-E1 hücrelerinde gen ifadelerini incelemişler, 100 ve 1000 ng/mL borun kültürün 8. gününde osteopontin seviyesini arttırdığını tespit etmişlerdir.

RT-PCR sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelelerinin MC3T3 kemik öncülü hücrelerinin farklılaşmasını ve hücre dışı matris oluşumunu desteklediği ancak B-HAp/kitosan doku iskelelerindeki bor katkısı nedeniyle bu etkinin daha belirgin olduğu saptanmıştır.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında mikrodalga ile desteklenmiş biyomimetik yöntem kullanılarak, bor katkılı HAp yapısının sentezi gerçekleştirilmiş ve karakterizasyon çalışmalarının tamamlanmasının ardından, kitosan iskelelerin benzer şekilde bor katkılı SBF içerisinde kaplanması sağlanmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- ❖ Çalışmanın ilk aşamasında, kullanılacak olan SBF ve bu SBF'ye ilave edilecek borik asit katkısının belirlenmesi amacıyla, çeşitli güçlerde mikrodalga ısımanın iyonlar üzerindeki etkisinden yararlanılarak bor katkılı hidroksiapatitin çökmesi sağlanmıştır. Sisteme dışarıdan verilen enerji sayesinde, oda koşullarında çökme gerçekleşmeyen B-SBF'den hızlı bir şekilde B-HAp çökmesi sağlanmıştır.
- ❖ Tez kapsamında farklı borik asit ilaveleri yapılmış 10xSBF kullanılarak mikrodalga etkisi ile oluşturulan B-HAp yapılarından uygun bor katkısına ve kemik benzeri yapıya sahip olanın elde edilmesi için, pH'ı NaOH ile ayarlanmış olan ve 10mg/mL borik asit içeren 10xSBF'nin 600 W gücünde 30sx9 tekrar ile çöktürülmesine karar verilmiştir.
- ❖ Elde edilen B-HAp yapılarının biyolojik apatit yapısına benzer şekilde amorf yapıda, ortalama 20-30 nm uzunluğunda ve çubuk benzeri morfolojide oldukları belirlenmiş, 1.40 (w/w) Ca/P oranı, % 1.15 (w/w) bor ve % 4.30 (w/w) karbonat içeriği ile de doğal kemik yapısına benzerliği gösterilmiştir.
- ❖ Deasetilasyon derecesi %75-80 olan kitosanın %2'lik (w/v) çözeltileri hazırlanarak dondurarak-kurutma yöntemi ile gözenekli yapıda ve içsel bağlantıları olan 9 mm çapına ve 2 mm kalınlığına sahip kitosan doku iskeleleri üretilmiştir.
- ❖ Kitosan doku iskelelerinin biyoaktivitesinin artırılması ve osteoindüktif etkiye sahip olması için bor katkılı SBF içerisinde B-HAp ile kaplanması sağlanmıştır. Karşılaştırma yapmak amacı ile boş kitosan ve bor katkısı içermeyen SBF ile yapılan kaplama sonucu elde edilen HAp/kitosan doku iskeleleri kullanılmıştır.

- ❖ Kaplama yapılırken mikrodalga'nın etkisinden yararlanılarak kitosanın fonksiyonel gruplarının uyarılması sağlanmış ve kimyasal bir modifikasyona ihtiyaç duyulmadan etkin bir kaplama yapılabilmektedir.
- ❖ Sisteme mikrodalga enerjisinin verilmesi ile kitosan üzerindeki aktif grupların yanında SBF içerisindeki iyonların da uyarılması sağlanmıştır. Böylece kitosanın fonksiyonelleştirilmesine ya da ek bir kimyasal işlem uygulanmasına gerek kalmadan kaplama daha etkin bir biçimde ve kısa sürede tamamlanmıştır.
- ❖ XRD ve SEM analizleri ile 600 W güçte 30sx9 tekrar ile üretilen kompozit yapılarıdaki kaplamanın yetersiz olduğu belirlenmiş ve aynı koşullarda kaplama 4 defa yapılmıştır.
- ❖ Yapılan XRD, ATR-FTIR ve SEM analizlerinde B-HAp yapısı ile elde edilen kaplamanın varlığı gösterilmiştir. SEM görüntüleri değerlendirilerek, yüzeyin ve gözeneklerin kaplandığı görülmüştür. Bor katkısı ile kristal boyutlarının küçüldüğü ve hidroksiapatit kaplamanın da daha homojen olduğu saptanmıştır.
- ❖ Şişme ve gözeneklilik çalışmaları, kitosan, HAp kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskeleleri kullanılarak karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Doku iskelelerinin şişme oranları sırasıyla; 34.90 ± 1.90 , 33.19 ± 1.73 , 28.91 ± 1.41 olarak, gözenekliliği ise sırasıyla 89.5 ± 1.03 , 81.9 ± 0.76 ve 85.7 ± 2.57 olarak bulunmuştur.
- ❖ L929 fibroblast ile gerçekleştirilen sitotoksikite çalışmalarında 9-300 µg arasında değişen bor konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin proliferasyonu MTT analizi ile morfolojisi kristal viyole boyaması ile incelenmiştir. 300 µg bor ilave edilen hücrelerin canlılığının 3. günde azaldığı belirlenmiştir. Diğer konsantrasyonların herhangi bir toksik etkisine rastlanmamıştır.
- ❖ MC3T3-E1 hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları kapsamında yapılan MTT ve SEM analizlerinde hücrelerin 3 farklı iskele yüzeyinde de tutunup çoğaldığı, ancak farklılaşmanın HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskelelerde olduğu hücre üzerindeki mineralize yapılar ile belirlenmiştir.
- ❖ Osteoblastik farklılaşmanın belirlenmesi amacıyla Kollajen-I (KOL-I), RunX2, osteokalsin (OCN), ve osteopontin (OPN) için RT-PCR analizi

yapılmıştır. KOL I gen ifadesi SEM görüntüleri ile uyumlu olacak şekilde 14.günde HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskelelerde artış göstermiş ve en yüksek değerler her zaman B-HAp/kitosan doku iskelesinde gözlenmiştir. Osteoblast farklılaşmasında önemli bir düzenleyici ve erken farklılaşmanın diğer bir belirteci olan RunX2 ekspresyonu ise 14.günde HAp/kitosan iskelede en yüksek seviyede belirlenmiştir Ancak B-HAp/kitosan iskelede de RunX2 ifadesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Geç osteoblastik farklılaşma belirteci olan OCN ifadesi her üç iskele grubunda da 7., 14 ve 21. günlerde logaritmik olarak artış göstermiş, ancak 14. günde B-HAp/kitosan iskelede anlamlı bir farklılık meydana gelmiştir. Ayrıca 21. günde en yüksek OCN seviyesi B-HAp/kitosana aittir. SEM fotoğraflarındaki mineralizasyon görüntüleri ile bu sonuçlar desteklenmektedir. Farklılaşmanın son basamağında ortaya çıkan osteopontin seviyeleri incelendiğinde ise B-HAp/kitosan iskelede her üç gün için de değerlerin en yüksek olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bulgular ışığında biyomimetik yöntemle üretilen ve bor katkısı ile osteoindüktif etkisi güçlendirilen hidroksiapatitin, kemik hasarlarının tedavisinde kullanılabilecek alternatif bir dolgu maddesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca mikrodalga destekli biyomimetik yöntem ile, kitosanın kimyasal modifikasyonuna ihtiyaç duyulmadan 3-boyutlu yapının gözenekleri boyunca etkin bir biçimde B-HAp kaplamanın yapılabildiği görüldüğünden, bu yaklaşımın diğer doku iskeleleri için de etkin bir HAp kaplama yöntemi olarak değerlendirilebileceği görüşüne varılmıştır. Özellikle B-HAp kaplamanın kitosan doku iskelesinin osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerini arttırdığı ve MC3T3 preosteoblastik hücrelerinin farklılaşmasını ve hücre dışı matris mineralizasyonunu diğer iskelelere göre daha fazla desteklediği görülmüştür. Sonuç olarak bor katkılı HAp ile elde edilen kompozit doku iskeleleri kemik doku mühendisliği uygulamaları için uygun biyomalzemeler olarak önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Büyüksağış, A., 316L paslanmaz çelik ve Ti6Al4V alaşımı üzerine sol jel yöntemi ile hidroksiapatit (HAP) kaplanması, *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7, 1-11, **2010**.
- [2] Burg, K.J., Porter, S., Kellam, J.F., Biomaterial developments for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 21, 2347-2359, **2000**.
- [3] Gümüşderelioğlu, M., Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, *Bilim ve Teknik Özel Eki*, TÜbitak Yayınları, **2007**.
- [4] Anderson, J.M., Patterson, J.L., Vines, J.B., Javed, A., Gilbert, S.R., Jun, H.-W., Biphasic peptide amphiphile nanomatrix embedded with hydroxyapatite nanoparticles for stimulated osteoinductive response, *ACS nano*, 5, 9463-9479, **2011**.
- [5] Zhou H., Lee, J., Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 7, 2769-2781, **2011**.
- [6] Wang, F., Li, M.S., A biomimetic method of hydroxyapatite powders synthesized in simulated body fluid, *Key Engineering Materials*, 297, 1371-1375, **2005**.
- [7] Nayak, A.K., Hydroxyapatite synthesis methodologies: An overview, *International Journal of Chemical Technology Research*, 2, 903-907, **2010**.
- [8] Zafer, E., Çeşitli iyonlar eklenmiş nanohidroksiapatitler: Üretim yöntemleri, İç yapı, mekanik ve biyouyumluluk özellikleri yönlerinden incelenmesi, *International Journal of Research and Development*, 3, 55-61, **2011**.
- [9] Taş C., Bhaduri, S.B., Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10x simulated body fluid, *Journal of Materials Research*, 19, 2742-2749, **2004**.
- [10] Mavis, B., Demirtas, T.T., Gümüşderelioğlu, M., Gunduz, G., Colak, U., Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 5, 3098-3111, **2009**.
- [11] Yuan, X., Mak, A.F.T., Li, J., Formation of bone-like apatite on poly(l-lactic acid) fibers by a biomimetic process, *Journal of Biomedical Materials Research*, 57, 140-150, **2001**.
- [12] Nielsen, F.H., Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats, *Biofactors*, 20, 161-171, **2004**.
- [13] Gallardo-Williams, M.T., Maronpot, R.R., Turner, C.H., Johnson, C.S., Harris, M.W., Jayo, M.J., Chapin, R.E., Effects of boric acid supplementation on bone histomorphometry, metabolism, and biomechanical properties in aged female F-344 rats, *Biological Trace Element Research*, 93, 155-169, **2003**.

- [14] Armstrong, T.A., Spears, J.W., Engle, T.E., Wright, C.L., Effect of dietary boron on bone characteristics and plasma parameters in young pigs, *Trace Elements in Man and Animals*, 10, 1067-1069, **2000**.
- [15] Hakki, S.S., Bozkurt, B.S., Hakki, E.E., Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 243-250, **2010**.
- [16] Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Biomaterials science: An introduction to materials in medicine, 3. Baskı, Elsevier Science, **2012**.
- [17] Bayçu, C., Kemik dokusu, Histoloji, (ed: Bayram, N.), T.C. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, Eskişehir, 124-144, **1995**.
- [18] Barrere, F., Van Blitterswijk, C.A., de Groot, K., Bone regeneration: Molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics, *International Journal of Nanomedicine*, 1, 317-332, **2006**.
- [19] Stevens, M.M., Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Today*, 11, 18-25, **2008**.
- [20] Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomaterialia*, 9, 7591-7621, **2013**.
- [21] Eijken, H.J.M., Human osteoblast differentiation and bone formation: Growth factors, hormones and regulatory networks, Doktora Tezi, The Netherlands Erasmus University Rotterdam, Rotterdam, **2007**.
- [22] Jayakumar, P., Di Silvio, L., Osteoblasts in bone tissue engineering, *Proceedings of The Institution of Mechanical Engineers*, 224, 1415-1440, **2010**.
- [23] Clarke, B., Normal bone anatomy and physiology, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, S131-139, **2008**.
- [24] Meyer, U., Wiesmann, H.P., Meyer, T., *Bone and cartilage engineering*, 1. Baskı, Springer, Berlin, **2006**.
- [25] Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L., Bone tissue engineering: State of the art and future trends, *Macromolecular Biosciences*, 4, 743-765, **2004**.
- [26] Ozan F., D.M.H., Pekedis, M., Yıldız, H., Bora, O.A., Nekroza uğramış kemikte allojenik mezenkimal kök hücrelerin kırık iyileşmesi üzerine etkisi, *Biyoteknoloji Elektronik Dergisi*, 1-9, **2010**.
- [27] Shea, L.D., Wang, D., Franceschi, R.T., Mooney, D.J., Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds, *Tissue Engineering*, 6, 605-617, **2000**.
- [28] Huri, P.Y., Hasırcı, N., Hasırcı, V., Bone tissue engineering, *Archives Medical Review Journal*, 19, 206-219, **2010**.
- [29] Yaszemski, M.J., Biomaterials in orthopedics, 2. Baskı, Taylor & Francis, **2003**.

- [30] Healy, K.,Guldborg, R., Bone tissue engineering, *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 7, 328, **2007**.
- [31] Polak, J.M.,Bishop, A.E., Stem cells and tissue engineering: Past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068, 352-366, **2006**.
- [32] Murphy, C.M., Haugh, M.G.,O'Brien, F.J., The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31, 461-466, **2010**.
- [33] Duan, B., Wang, M., Zhou, W.Y., Cheung, W.L., Li, Z.Y.,Lu, W.W., Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 6, 4495-4505, **2010**.
- [34] Liu, H., Raghavan, D.,Stubbs, J., Evaluation of the biological responses of osteoblast-like UMR-106 cells to the engineered porous PHBV matrix. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81, 669-677, **2007**.
- [35] Bose, S., Roy, M., Bandyopadhyay, A., Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends in Biotechnology*, 30, 546–554, **2012**.
- [36] Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A.,Chiellini, E., Polymeric materials for bone and cartilage repair,*Progress in Polymer Science*, 35, 403-440, **2010**.
- [37] Rezwan, K., Chen, Q., Blaker, J.,Boccaccini, A.R., Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering,*Biomaterials*, 27, 3413-3431, **2006**.
- [38] Pasinli, A., Aksoy, R.S., Yapay kemik uygulamaları İçin hidroksiapatit,*Electronic Journal of BioTechnology*, 1, 41-51, **2010**.
- [39] Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z.,Chua, C.-K., The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors, *Tissue Engineering*, 7, 679-689, **2001**.
- [40] Mitra, J., Tripathi, G., Sharma, A.,Basu, B., Scaffolds for bone tissue engineering: Role of surface patterning on osteoblast response,*Royal Society of Chemistry Advances*, 3, 11073-11094,**2013**.
- [41] Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S.,Kenny, J., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review,*Polymer degradation and stability*, 95, 2126-2146, **2010**.
- [42] Correlo, V.M., Oliveira, J.M., Mano, J.F., Neves, N.M.,Reis, R.L., Principles Of Regenerative Medicine Second Edition, (eds: A. Anthony, et al.), Academic Press: San Diego, 557-586, 2011.
- [43] Wei, G.,Ma, P.X., Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 25, 4749-4757, **2004**.

- [44] Leong, K., Cheah, C., Chua, C., Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 24, 2363-2378, **2003**.
- [45] Tsang, V.L., Bhatia, S.N., Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1635-1647, **2004**.
- [46] Tsiridis, E., Upadhyay, N., Giannoudis, P., Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules?, *Injury*, 38, 11-25, **2007**.
- [47] Akman, A.C., Tıǧlı, R.S., Gümüřderelioǧlu, M., Nohutcu, R.M., Bone morphogenetic protein-6-loaded chitosan scaffolds enhance the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells, *Artificial Organs*, 34, 65-74, **2010**.
- [48] Saito, N., Takaoka, K., New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 2287-2293, **2003**.
- [49] Li, C., Vepari, C., Jin, H.-J., Kim, H.J., Kaplan, D.L., Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 3115-3124, **2006**.
- [50] Ramoshebi, L.N., Matsaba, T.N., Teare, J., Renton, L., Patton, J., Ripamonti, U., Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4, 1-11, **2002**.
- [51] Akman, A.C., Tıǧlı, R.S., Gümüřderelioǧlu, M., Nohutcu, R.M., bFGF-loaded HA-chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92, 953-962, **2010**.
- [52] Coelho, M., Fernandes, M., Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation, *Biomaterials*, 21, 1095-1102, **2000**.
- [53] Peter, S.J., Liang, C.R., Kim, D.J., Widmer, M.S., Mikos, A.G., Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, β -glycerolphosphate, and L-ascorbic acid, *Journal of Cellular Biochemistry*, 71, 55-62, **1998**.
- [54] Mahmoudifar, N., Doran, P.M., Osteogenic differentiation and osteochondral tissue engineering using human adipose-derived stem cells, *Biotechnology progress*, 29, 176-185, **2013**.
- [55] Yeřilbaǧ, D., Hayvan beslemede bor elementinin kullanımı. *Uludaǧ Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Dergisi*, 27, 61-68, **2008**.
- [56] Devirian, T.A., Volpe, S.L., The physiological effects of dietary boron, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 219-231, **2003**.
- [57] Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü., <http://www.etimaden.gov.tr/bor-turkiye-tarihcesi-74s.Htm> (Temmuz, **2013**).

- [58] Bilgiç M., D.M., Borun özellikleri ve tekstil endüstrisinde kullanımıyla sağladığı avantajlar, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7, 27-37, **2013**.
- [59] Roskill Information Services, Ltd., *Boron: Global Industry Markets and Outlook*, 12th edition, **2010**.
- [60] Ayşegül, Y., Her derde deva hazinemiz bor, *Bilim ve Teknik Dergisi*. TÜBİTAK Yayınları, Mayıs **2002**.
- [61] Yenmez, N., Stratejik bir maden olarak bor minerallerin Türkiye için önemi, *Coğrafya Dergisi*, 19, 59-94, **2011**.
- [62] Çalık, A., Türkiye'nin bor madenleri ve özellikler, *Mühendis ve Makine Dergisi*, 508, 1-9, **2002**.
- [63] Scorei, R., Is boron a prebiotic element? A mini-review of the essentiality of boron for the appearance of life on earth, *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 42, 3-17, **2012**.
- [64] Demir, B.S., *Borun İnsan ve bitki İçin önemi ve bazı üzüm çeşitlerinde bor tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2005**.
- [65] Devlet Planlama Teşkilatı, *Yedinci beşyillik kalkınma planı*, Ankara, **1995**.
- [66] Yenialaca, Ç., *Bor ve kullanım alanları*, Yüksek Lisans Tezi, T.C Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Ankara, **2009**.
- [67] Kaya, S., *Bor: Geleceğin Enerji Kaynağı*, İzmir Ticaret Odası: AR&GE Bülten, **2009**.
- [68] Uslu, T., Bor madenlerinin enerji kaynağı olarak kullanılması, TMMOB Türkiye VI. Enerji Sempozyumu - Küresel Enerji Politikaları ve Türkiye Gerçeği, , Ankara, **2007**.
- [69] Demirtaş, A., Bor bileşikleri ve tarımda kullanımı, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 37, 111-115, **2006**.
- [70] Çahk, A., *Makine ve Metalürji Sanayinde Bor Kullanımı*, II. Uluslararası Bor Sempozyumu, Eskişehir, **2004**.
- [71] Uzun, H.A., *Borlama ile yüzeyleri setleştirilen çeliklerin aşınma ve korozyona dayanımları*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, **2002**.
- [72] Eren, M., Bor'un Biyolojik Önemi ve Metabolizma Üzerine Etkileri, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, 55-59, **2004**.
- [73] Ku, W.W., Chapin, R.E., Moseman, R.F., Brink, R.E., Pierce, K.D., Adams, K.Y., Tissue disposition of boron in male fischer rats, *Toxicology and applied pharmacology*, 111, 145-151, **1991**.
- [74] Demirtaş, A., Bor'un İnsan beslenmesi ve sağlığı açısından önemi, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41, 75-80, **2010**.
- [75] Bakirdere, S., Oerenay, S., Korkmaz, M., Effect of boron on human health, *Open Mineral Processing Journal*, 3, 54-59, **2010**.

- [76] Penland, J.G., Dietary boron, brain function, and cognitive performance, *Environmental Health Perspectives*, 102, 65-72, **1994**.
- [77] Benderdour, M., Hess, K., Gadet, M.D., Dousset, B., Nabet, P., Belleville, F., Effect of boric acid solution on cartilage metabolism, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 234, 263-268, **1997**.
- [78] Nielsen, F.H., Shuler, T.R., Studies of the interaction between boron and calcium, and its modification by magnesium and potassium, in rats. Effects on growth, blood variables, and bone mineral composition, *Biological Trace Element Research*, 35, 225-237, **1992**.
- [79] Barranco, W.T., Eckhert, C.D., Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation, *Cancer letters*, 216, 21-29, **2004**.
- [80] Barth, R., Soloway, A.H., Fairchild, R.G., Boron neutron capture therapy for cancer, *Scientific American*, 263, **1990**.
- [81] Gregory S. Kelly, N.D., Boron: A review of its nutritional interactions and therapeutic uses, *Alternative Medicine Review*, 2, 48-56, **1997**.
- [82] Murray, F.J., A human health risk assessment of boron (boric acid and borax) in drinking water, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 22, 221-230, **1995**.
- [83] Habibovic, P., Barrere, F., Blitterswijk, C.A., Groot, K., Layrolle, P., Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants, *Journal of the American Ceramic Society*, 85, 517-522, **2002**.
- [84] Hunt, C.D., Nielsen, F.H., Dietary boron affects bone calcification in magnesium and cholecalciferol deficient chicks, *In Trace Elements In Man and Animals* 6, 275-276, **1989**.
- [85] Newnham, R.E., Essentiality of boron for healthy bones and joints, *Environmental Health Perspectives*, 102, 83-85, **1994**.
- [86] Nielsen, F.H., Hunt, C.D., Mullen, L.M., Hunt, J., Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women, *The FASEB Journal*, 1, 394-397, **1987**.
- [87] Demirer, S., Kara, M., Erciyas, K., Ozdemir, H., Ozer, H., Ay, S., Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats, *Archives of Oral Biology*, 57, 60-65, **2012**.
- [88] Wu, C., Miron, R., Sculean, A., Kaskel, S., Doert, T., Schulze, R., Zhang, Y., Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds, *Biomaterials*, 32, 7068-7078, **2011**.
- [89] Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., Kou, D., Shen, Y., Cheng, X., Rompis, F.A., Peng, L., Zhu Lu, C., Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells, *Biological Trace Element Research*, 144, 306-315, **2011**.

- [90] Uysal, U., Nano ve mikron boyutta hidroksiapatit üretimine proses parametrelerinin etkisinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, **2012**.
- [91] Murugan, R., Ramakrishna, S., Development of nanocomposites for bone grafting, *Composites Science and Technology*, 65, 2385-2406, **2005**.
- [92] Komlev, V., Fadeeva, I., Gurin, A., Kovaleva, E., Smirnov, V., Gurin, N., Barinov, S., Effect of the concentration of carbonate groups in a carbonate hydroxyapatite ceramic on its in vivo behavior, *Inorganic Materials*, 45, 329-334, **2009**.
- [93] Cengiz, B., Hidroksiapatit nanoparçacıkların sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, **2007**.
- [94] Rouahi, M., Gallet, O., Champion, E., Dentzer, J., Hardouin, P., Anselme, K., Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 78, 222-235, **2006**.
- [95] Balamurugan, A., Michel, J., Faure, J., Benhayoune, H., Wortham, L., Sockalingum, G., Banchet, V., Bouthors, S., Laurent-Maquin, D., Balossier, G., Synthesis and structural analysis of sol gel derived stoichiometric monophasic hydroxyapatite, *Ceramics- Silikaty*, 50, 27-31, **2006**.
- [96] Brendel, T., Engel, A., Rüssel, C., Hydroxyapatite coatings by a polymeric route, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 3, 175-179, **1992**.
- [97] Chen, F., Wang, Z.-C., Lin, C.-J., Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials, *Materials Letters*, 57, 858-861, **2002**.
- [98] Bouyer, E., Gitzhofer, F., Boulos, M., Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11, 523-531, **2000**.
- [99] Wang, Y., Chen, J., Wei, K., Zhang, S., Wang, X., Surfactant-assisted synthesis of hydroxyapatite particles, *Materials Letters*, 60, 3227-3231, **2006**.
- [100] Han, J.-K., Song, H.-Y., Saito, F., Lee, B.-T., Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method, *Materials Chemistry and Physics*, 99, 235-239, **2006**.
- [101] Sampath K., T., Manjubala, I., Gunasekaran, J., Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave irradiation, *Biomaterials*, 21, 1623-1629, **2000**.
- [102] Nazir, R., Iqbal, N., Khan, A.S., Akram, A., Asif, A., Chaudhry, A.A., Rehman, I.U., Hussain, R., Rapid synthesis of thermally stable hydroxyapatite, *Ceramics International*, 38, 457-462, **2012**.

- [103] Rameshbabu, N., Rao, K.P., Microwave synthesis, characterization and in-vitro evaluation of nanostructured biphasic calcium phosphates, *Current Applied Physics*, 9, 29-31, **2009**.
- [104] Kimura, I., Honma, T., Riman, R.E., Preparation of hydroxyapatite microspheres by interfacial reaction in a multiple emulsion, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 115, 888-893, **2007**.
- [105] Zhao, X., Yang, L., Zuo, Y., Xiong, J., Hydroxyapatite coatings on titanium prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17, 667-671, **2009**.
- [106] Aday, S., Gümüşderelioğlu, M., Bone-like apatite-coated chitosan scaffolds: Characterization and osteoblastic activity, *Polymer Composites*, 31, 1418-1426, **2010**.
- [107] Barrere, F., Van Blitterswijk, C.A., de Groot, K., Layrolle, P., Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFX5 solution, *Biomaterials*, 23, 1921-1930, **2002**.
- [108] Jalota, S., Bhaduri, S.B., Tas, A.C., Osteoblast proliferation on neat and apatite-like calcium phosphate-coated titanium foam scaffolds, *Materials Science and Engineering: C*, 27, 432-440, **2007**.
- [109] Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T., Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, *Journal of Biomedical Materials Research*, 24, 721-734, **1990**.
- [110] Tas, C.A., Synthesis of biomimetic ca-hydroxyapatite powders at 37 c in synthetic body fluids, *Biomaterials*, 21, 1429-1438, **2000**.
- [111] Bigi, A., Boanini, E., Panzavolta, S., Roveri, N., Biomimetic growth of hydroxyapatite on gelatin films doped with sodium polyacrylate, *Biomacromolecules*, 1, 752-756, **2000**.
- [112] Oyane, A., Kim, H.M., Furuya, T., Kokubo, T., Miyazaki, T., Nakamura, T., Preparation and assessment of revised simulated body fluids, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 65, 188-195, **2003**.
- [113] Kokubo, T., Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment, *Acta Materialia*, 46, 2519-2527, **1998**.
- [114] Lakhkar, N.J., Lee, I.-H., Kim, H.-W., Salih, V., Wall, I.B., Knowles, J.C., Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: Role and controlled delivery from phosphate-based glasses, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 405-420, **2013**.
- [115] Evis, Z., Al³⁺ doped nano-hydroxyapatites and their sintering characteristics, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 114, 1001-1004, **2006**.
- [116] Kannan, S., Rebelo, A., Ferreira, J., Novel synthesis and structural characterization of fluorine and chlorine co-substituted hydroxyapatites, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 1692-1697, **2006**.

- [117] Mróz, W., Bombalska, A., Burdyńska, S., Jedyński, M., Prokopiuk, A., Budner, B., Ślósarczyk, A., Zima, A., Menaszek, E., Ścisłowska-Czarnecka, A., Structural studies of magnesium doped hydroxyapatite coatings after osteoblast culture, *Journal of Molecular Structure*, 977, 145-152, **2010**.
- [118] Webster, T.J., Massa-Schlueter, E.A., Smith, J.L., Slamovich, E.B., Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations, *Biomaterials*, 25, 2111-2121, **2004**.
- [119] Ito, A., H.A., Akao, M., Miura, M., Otsuka, R., Tsutsumi, S., Structure of Borate Groups in Boron-Containing Apatite, *Journal of The Ceramic Society of Japan*, 96, 707-709, **1988**.
- [120] Ternane, R., Cohen-Adad, M.T., Panczer, G., Goutaudier, C., Kbir-Arigoib, N., Trabelsi-Ayedi, M., Florian, P., Massiot, D., Introduction of boron in hydroxyapatite: Synthesis and structural characterization, *Journal of Alloys and Compounds*, 333, 62-71, **2002**.
- [121] Baykal, A., Kızılyallı, M., Bor ihtiva eden apatit yapıların sentezi ve karakterizasyonu, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5, 153-160, **2003**.
- [122] Güler, H., Gündoğmaz, G., Kurtuluş, F., Çelik, G., Gacanoğlu, Ş., Solid state synthesis of calcium borohydroxyapatite, *Solid State Sciences*, 13, 1916-1920, **2011**.
- [123] Gündoğmaz, G., Güler, H., Kolemanit ve diamonyum fosfatın farklı yüksek sıcaklıklarda oluşturduğu ürünlerin yapılarının karakterizasyonu, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10, 3-18, **2008**.
- [124] Kawabata, K., Tsuru, K., Hayakawa, S., Osaka, A., Jaeger, C., Fujii, E., Sakai, A., Preparation and characterization of boron-containing hydroxyapatite, *Key Engineering Materials*, 361, 191-194, **2008**.
- [125] Hayakawa, S., Osaka, A., Jaeger, C., Barheine, S., A NMR investigation of borate incorporation in apatitic biomaterials, *Key Engineering Materials*, 396, 205-208, **2009**.
- [126] Barheine, S., Hayakawa, S., Osaka, A., Jaeger, C., Surface, interface, and bulk structure of borate containing apatitic biomaterials, *Chemistry of Materials*, 21, 3102-3109, **2009**.
- [127] Barheine, S., Hayakawa, S., Jäger, C., Shirotsaki, Y., Osaka, A., Effect of disordered structure of boron-containing calcium phosphates on their in vitro biodegradability, *Journal of the American Ceramic Society*, 94, 2656-2662, **2011**.
- [128] Thostenson, E., Chou, T.-W., Microwave processing: Fundamentals and applications, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 30, 1055-1071, **1999**.
- [129] Gümüşderelioğlu M., K.G., Mikrodalgalar ve uygulamaları, *Bilim ve Teknik*, Tübitak, Temmuz, **2012**,.

- [130] Durukan, M.D., Mikrodalga-destekli kitosan/hidroksiapatit doku İskelesi üretimi ve *In vitro* kemik doku mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2012**.
- [131] Kuşlu S., B.M., Mikrodalgalar ile materyaller arasındaki termal olan ve olmayan etkileşimlerin incelenmesi ve mikrodalga kimyası, *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, 395-405, **2002**.
- [132] Beşkardeş, I.G., Demirtaş, T.T., Durukan, M.D., Gümüşderelioğlu, M., Microwave-assisted fabrication of chitosan-hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds, *Journal Of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **2012**.
- [133] Kaynak, G., Mikrodalga destekli çapraz bağlanma/çökeltme reaksiyonları ile kitosan-hidroksiapatit doku İskelelerinin hazırlanması ve kemik doku mühendisliğinde kullanımının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2012**.
- [134] LeGeros, R.Z., Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395, 81-98, **2002**.
- [135] Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Thomas, P., Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*, 23, 1065-1072, **2002**.
- [136] Ślósarczyk, A., Paszkiewicz, Z., Paluszkiwicz, C., FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods, *Journal of Molecular Structure*, 744-747, 657-661, **2005**.
- [137] Kannan, S., Vieira, S.I., Olhero, S.M., Torres, P.M., Pina, S., Silva, O.A., Ferreira, J.M., Synthesis, mechanical and biological characterization of ionic doped carbonated hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate mixtures, *Acta Biomaterialia*, 7, 1835-1843, **2011**.
- [138] Tasli, P.N., Dogan, A., Demirci, S., Sahin, F., Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) *in vitro*, *Biological Trace Element Research*, 153, 419-427, **2013**.
- [139] Baykal, A., Gurbuz, G., Kizilyalli, M., Kniep, R., Discussion on the structure of boron containing apatite, *Euro Ceramics VIII*, 2017-2021, **2004**.
- [140] Nakamura, M., Zhuang, Z., Aizawa, M., Fabrications of boron-containing apatite ceramics via ultrasonic spray-pyrolysis route and their surface properties, *Key Engineering Materials*, 529, 109-113, **2013**.
- [141] Königsberger, E., Königsberger, L., Biom mineralization: Medical aspects of solubility, *Wiley Online Library*, **2006**.
- [142] Janus, A.M., Faryna, M., Haberko, K., Rakowska, A., Panz, T., Chemical and microstructural characterization of natural

- hydroxyapatite derived from pig bones, *Microchimica Acta*, 161, 349-353, **2008**.
- [143] Landi, E., Logroscino, G., Proietti, L., Tampieri, A., Sandri, M., Sprio, S., Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 239-247, **2008**.
- [144] Murugan, R., Ramakrishna, S., Production of ultra-fine bioresorbable carbonated hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia*, 2, 201-206, **2006**.
- [145] Koutsopoulos, S., Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods, *Journal of Biomedical Materials Research*, 62, 600-612, **2002**.
- [146] Farzadi, A., Solati-Hashjin, M., Bakhshi, F., Aminian, A., Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation, *Ceramics International*, 37, 65-71, **2011**.
- [147] Tadic, D., Epple, M., A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone, *Biomaterials*, 25, 987-994, **2004**.
- [148] Landi, E., Celotti, G., Logroscino, G., Tampieri, A., Carbonated hydroxyapatite as bone substitute, *Journal of the European Ceramic Society*, 23, 2931-2937, **2003**.
- [149] Fleet, M.E., Infrared spectra of carbonate apatites: N2-region bands, *Biomaterials*, 30, 1473-1481, **2009**.
- [150] Venugopal, J., Prabhakaran, M.P., Zhang, Y., Low, S., Choon, A.T., Ramakrishna, S., Biomimetic hydroxyapatite-containing composite nanofibrous substrates for bone tissue engineering, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368, 2065-2081, **2010**.
- [151] Tıǧlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüşderelioǧlu, M., *In vitro* characterization of chitosan scaffolds: Influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-1674, **2007**.
- [152] Palmer, L.C., Newcomb, C.J., Kaltz, S.R., Spoerke, E.D., Stupp, S.I., Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chemical Reviews*, 108, 4754, **2008**.
- [153] Tuzlakoglu, K., Reis, R., Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by a biomimetic spraying process, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1279-1286, **2007**.
- [154] Leonor, I.B., Baran, E.T., Kawashita, M., Reis, R.L., Kokubo, T., Nakamura, T., Growth of a bonelike apatite on chitosan microparticles after a calcium silicate treatment, *Acta Biomaterialia*, 4, 1349-1359, **2008**.

- [155] Kawashita, M., Nakao, M., Minoda, M., Kim, H.-M., Beppu, T., Miyamoto, T., Kokubo, T., Nakamura, T., Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid, *Biomaterials*, 24, 2477-2484, **2003**.
- [156] Maachou, H., Bal, K., Bal, Y., Chagnes, A., Cote, G., Aliouche, D., *In vitro* biomineralization and bulk characterization of chitosan/hydroxyapatite composite microparticles prepared by emulsification cross-linking method: Orthopedic use. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 1459-1475, **2012**.
- [157] Kromka, A., Grausova, L., Bacakova, L., Vacik, J., Rezek, B., Vanecek, M., Williams, O.A., Haenen, K., Semiconducting to metallic-like boron doping of nanocrystalline diamond films and its effect on osteoblastic cells, *Diamond and Related Materials*, 19, 190-195, **2010**.
- [158] Madihally, S.V., Matthew, H.W.T., Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 20, 1133-1142, **1999**.
- [159] Singh, V., Tripathi, D.N., Tiwari, A., Sanghi, R., Microwave promoted synthesis of chitosan-graft-poly (acrylonitrile), *Journal of Applied Polymer Science*, 95, 820-825, **2005**.
- [160] Thein-Han, W., Misra, R., Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 5, 1182-1197, **2009**.
- [161] Manjubala, I., Scheler, S., Bossert, J., Jandt, K.D., Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique, *Acta Biomaterialia*, 2, 75-84, **2006**.
- [162] Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X., Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700, **2004**.
- [163] Li, H., Zhou, C.-R., Tian, J.-H., Rong, J.-H., Preparation and characterization of homogeneous hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds via in-situ hydration, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 1, 42-49, **2010**.
- [164] Fraga, A.F., Rigo, E.C.D.S., Boschi, A.O., Synthesis of chitosan/hydroxyapatite membranes coated with hydroxycarbonate apatite for guided tissue regeneration purposes, *Applied Surface Science*, 257, 3888-3892, **2011**.
- [165] Beşkardeş, I., *Biyoseramik ve biyosinyal moleküllerle desteklenmiş poli(kaprolakton) doku iskeleleri: Sentez, karakterizasyon ve kemik doku mühendisliği uygulamaları*, Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
- [166] Liu, Y., Wu, G., de Groot, K., Biomimetic coatings for bone tissue engineering of critical-sized defects, *Journal of The Royal Society Interface*, 7, 631-647, **2010**.

- [167] Guo, T., Zhao, J., Chang, J., Ding, Z., Hong, H., Chen, J., Zhang, J., Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor- β 1 for chondrocytes proliferation, *Biomaterials*, 27, 1095-1103, **2006**.
- [168] Chen, F., Lee, C.N., Teoh, S.H., Nanofibrous modification on ultra-thin poly(e-caprolactone) membrane via electrospinning, *Materials Science and Engineering: C*, 27, 325-332, **2007**.
- [169] Stein, G.S., Lian, J.B., Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype, *Endocrinology Review*, 14, 424-442, **1993**.
- [170] Kaveh, K., Ibrahim, R., Abu Bakar, Z., Ibrahim, T.A., Mesenchymal stem cells, osteogenic lineage and bone tissue engineering: A review, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 2317-2330, **2011**.
- [171] Grausova, L., Kromka, A., Burdikova, Z., Eckhardt, A., Rezek, B., Vacik, J., Haenen, K., Lisa, V., Bacakova, L., Enhanced growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells on boron-doped nanocrystalline diamond thin films, *Plos One*, 6, e20943, **2011**.
- [172] Park, J.-B., The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and osteopontin expression, *Journal of Surgical Research*, 173, 99-104, **2012**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Özge Ekin TUNÇAY
Doğum Yeri : Adana
Medeni Hali : Bekar
E-posta : ekntncy@gmail.com
Adresi : Barış Manço Bul. No:11 3/5 Çukurova /Adana

Eğitim

Lise : Adana Anadolu Lisesi (2004)
Lisans : Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2010)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Doktora : -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (ileri), Almanca (başlangıç)

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

Doku mühendisliği, biyomalzemeler, hayvan hücre kültürleri.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

TÜBİTAK PROJESİ, Proje No: 112M705, Mikrodalga desteği ile biyomimetik hidroksiapatit (HAp)-bor katkılı HAp oluşumu ve kitosan-HAp kemik doku iskelelerinin geliştirilmesi, 200,000 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-