ORTOPEDİDE ALTERNATİF KEMİK BİYO-GREFTLERİNİN ÜRETİMİ ve İN VİVO/İN VİTRO BİYOUYUMLULUK -BİYOMEKANİK ANALİZLERİ

Yük. Müh. Mehtap DEMİREL

Doktora Tezi

Makina Eğitimi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bünyamin AKSAKAL

TEMMUZ-2012

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORTOPEDİDE ALTERNATİF KEMİK BİYO-GREFTLERİNİN ÜRETİMİ ve İN VİVO/İN VİTRO BİYOUYUMLULUK -BİYOMEKANİK ANALİZLERİ

DOKTORA TEZİ

Yük. Müh. Mehtap DEMİREL

(Enstitü No: 07219204)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26 Haziran 2012
Tezin Savunulduğu Tarih : 13 Temmuz 2012

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Bünyamin AKSAKAL (F.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Yaşar TOTİK (A.Ü)
Prof. Dr. Halis ÇELİK (F.Ü)
Doç. Dr. Vedat SAVAŞ (F.Ü)
Yrd. Doç. Dr. Faruk KARACA (F.Ü)

TEMMUZ-2012

TEŞEKKÜR

Bu detaylı ve multi disipliner çalışma süresince bana her konuda destek olan, bilgilerinden ve yardımlarından her alanda faydalandığım sayın hocam ***Prof. Dr. Bünyamin AKSAKAL'***a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, in vivo hayvan deneyleri kısmındaki katkılarından dolayı ***Yrd. Doç.Dr. Mustafa KÖM'***e histopatolojik inceleme ve değerlendirme bölümünde **Prof. Dr. İbrahim H. Özercan** ve ekibine, **Yrd. Doç. Dr. Faruk KARACA** ile **Arş. Gör. Yakup SAY**'a deneyler sırasındaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma, FÜBAP'a sunulan ve kabul edilen FÜBAP1595 (altyapı) ve TEKF.11.01 no'lu araştırma projeleri yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamda mekanik testler sırasındaki yardımlarından dolayı F.Ü. Makine Atelyesi personeline ve in vivo hayvan deneylerindeki katkılarıyla FÜDAM çalışanlarına da teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmam süresince bana her türlü desteği veren **Aileme** sonsuz teşekkürleri borç bilirim.

Elazığ 2012 Mehtap DEMİREL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR I

İÇİNDEKİLER II

TABLOLAR LİSTESİ VII

ŞEKİLLER LİSTESİ IX

ÖZET XX

ABSTRACT XXII

SİMGELER XXIV

KISALTMALAR XXV

1.GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 9

2.1. Kemik, Temel Yapısı ve Kompozisyonu 10

2.2. Kemik Matrisin Temel Bileşenleri 12

2.3. Kemiğin Kan Akımı 13

2.4. Kemik Hücrelerinin Morfolojisi 14

2.5. Kemiğin Mekanik Özellikleri 15

2.6. Kemik Kırıkları 20

2.6.1. Kırık Tipleri 20

2.6.2. Kırık Mekanizması 22

2.6.2.1. Yorulma Kırıkları 24

2.7. Kemik Kırıklarının İyileşmesi 24

2.8. Vaskülarize Serbest Kemik Greftleri 25

2.9. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler 26

2.10. Biyomalzemeler 29

2.10.1. Metalik Biyomalzemeler 30

2.10.2. Biyoseramikler ve Biyocamlar 32

2.10.2.1. Seramik ve Cam Biyomalzemelerde Yapı Özellik İlişkisi 32

2.10.2.2. Seramiklerin Çözünmeleri (Degradation) 33
2.10.2.3. Seramik ve Cam Malzemelerin Mekanik Özellikleri 33
2.10.3. Polimerik Biyomalzemeler 38
2.10.4. Kompozit Malzemeler 39
2.10.4.1. Kompozitin Organik Kısmı (Biyobozunur Polimerler) 40
2.10.4.2. Kompozitin İnorganik Kısmı 41
2.10.5. Hidroksiapatit 41
2.10.5.1. Kemik Dokusundaki Hidroksiapatit 44
2.10.5.2. Hidroksiapatitin Biyouyumluluğu 44
2.10.5.3. Hidroksiapatitin Üretim Yöntemleri 45
2.10.5.4. Hidroksiapatit'in Klinik Uygulamaları 46
2.10.6. Trikalsiyum Fosfatlar 47
2.11. Biyomalzemelerin Sol-Jel Yöntemiyle Üretilmesi 47
2.11.1. Sol-Jel işleminde Kullanılan Çözücüler 48
2.11.2. Sol-Jel İşleminin Avantaj Ve Dezavantajları 49
2.11.3. Uygulama Alanları 51
2.12. Biyouyumluluk 53
2.12.1. Biyouyumluluğu Belirleyen Bazı Malzeme Özellikleri 54
2.12.2. Vücudun Biyomalzemelere Tepkisi 55
2.12.2.1. İnflamasyon 55
2.12.2.2. Biyomalzeme Kullanıldığı Durumlarda Vücudun Biyouyumluluk Özellikleri 56
2.12.2.3. Enfeksiyon 56
2.12.3. Seramiklerin Biyouyumluluğu 57
2.12.4. Polimerlerin Biyouyumluluğu 57
2.12.5. Metallerin Biyouyumluluğu 57
2.13. Biyomalzemelerin Mekanik Özellikleri 58
2.13.1. Mühendislik Malzemeleri 58
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 66

3.1. Kullanılan Malzemeler 66

3.2. Biyo-Greft Üretim Yöntemi 66

3.3. Biyo-Greft Üretim Aşamaları 68

3.3.1. Hidroksiapatit Sentezi (I. Grup) 68

3.3.2. Hidroksiapatit Esaslı Biyo-Greftlerin Hazırlanması (II. Grup) 70

3.3.3. Hidroksiapatit Esaslı ve Sübye Kemiği (Cuttle Fish), Lületaşı (Sepiolite) ve Yumurta Kabuğu (Eggs Shell) İçerikli Biyo-Greftlerin Üretilmesi (III. Grup) 71

3.3.4. Poroz Yapıda (HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Tozu Esaslı) Biyo-Greftlerin Üretilmesi (IV. Grup) 75

3.4. Malzeme Karekterizasyonu 77

3.4.1. SEM-EDX Analizi 77

3.4.2. XRD Analizi 77

3.4.3. FTIR Analizi 77

3.5. Biyomekanik Testler 77

3.6. İn Vivo Deneyler 78

3.6.1. ICP-MS Analizleri 78

3.7. İn Vitro Deneyler 78

3.7.1. Sitotoksisite Deneyleri 79

3.8. Üretilen Biyo-Greftlerin Porozite (%) Ölçümleri 79

4. SONUÇLAR 80

4.1. FTIR 81

4.1.1. I. Grup Biyo-Greftlerin FTIR Sonuçları 81

4.1.2. II. Grup Biyo-Greftlerin FTIR Sonuçları 82

4.1.3. III. Grup (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) Biyo-Greftlerin FTIR Sonuçları 83

4.1.4. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Esaslı) Biyo-Greftlerin FTIR Sonuçları 89

4.2. XRD Analizleri 92

4.2.1. I. Grup Biyo-Greftlerin XRD Sonuçları 92

4.2.2. II. Grup Biyo-Greftlerin XRD Sonuçları 94

4.2.3. III. Grup (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) Biyo-Greftlerin XRD Analizleri....97

4.2.4. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Tozu Esaslı) Biyo-Greftlerin XRD Analizleri....102

4.3.SEM ve EDX Analizleri....106

4.3.1. I. Grup Biyo-Greftlerin SEM-EDX Analizleri....106

4.3.1.1.Üretilen Hidroksiapatitlerin Partikül Boyut Analizi....115

4.3.2. II. Grup Biyo-Greftlerin SEM-EDX Analizleri....116

4.3.3. III Grup Biyo-Greftlerin (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) SEM Görüntüleri....123

4.3.4. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Esaslı) Biyo-Greftlerin SEM-EDX Sonuçları....163

4.3.4.1.Porozite Analizleri....193

4.4.Biyomekanik Testler (Basma Testleri)....194

4.4.1. I. Grup Biyo-Greftlerin Basma Testleri....195

4.4.2. II. Grup Biyo-Greftlerin Basma Testleri....198

4.4.3. III. Grup (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) Biyo-Greftlerin Basma Testleri....200

4.4.4. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Tozu Esaslı) Biyo-Greftlerin Basma Testleri....204

4.5.Sertlik Deneyleri....210

4.5.1. I ve II. Grup Biyo-Greftlerin Sertlik Testleri....210

4.5.2. III. Grup (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) Biyo-Greftlerin Sertlik Testleri....212

4.5.3. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Tozu Esaslı) Biyo-Greftlerin Sertlik Testleri....214

4.6. İn Vivo Canlı Hayvan Deneyleri....216

4.6.1. I ve II. Gruptaki (H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu)Biyo-Greftlerin İn Vivo Deneyinin (Delik Açılarak) Operasyon İşlemleri....218

4.6.1.1. I ve II. Gruptaki (H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 Kodlu) Biyo-Greftlerin Doku Cevabına Yönelik Histopatolojik İncelemeleri....227

4.6.1.2. Biyo-Greft Bölgelerinde SEM-EDX Analizleri (İn Vivo)....236

4.6.2. I. ve II. Gruptaki (H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu) Biyo-Greftlerin İn Vivo Boşluk Açma Operasyon İşlemleri....250

4.6.2.1. Biyo-Greft Bölgelerinde ICP-MS Analizleri (İn Vivo)....261

4.6.2.2. Biyomekanik Analizler (Üç Nokta Eğme Testleri)....262

4.6.2.3. I ve II. Gruptaki (H60, H30Ca, H50Y10 Kodlu) Biyo-Greftlerin Doku Cevabına Yönelik Histopatolojik İncelemeleri....267

4.7. İN VİTRO ANALİZLERİ....274

4.7.1. Sitotoksisite Deneyleri....274

5.TARTIŞMA....285

6. GENEL SONUÇLAR....298

KAYNAKLAR....300

ÖZGEÇMİŞ....319

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Işık mikroskopisi altında osteosit ve lakünaların sınıflandırılması.....15

Tablo 2.2. Bazı Kemiklerle İlgili Mekanik Özellikler [97].....16

Tablo 2.3. Ev sahibi ortamı etkileyebilecek malzemenin sahip olduğu karakteristik değişkenler....26

Tablo 2.4. Ev sahibi ortamın biyomalzemeye karşı gösterebileceği tepkiler.....27

Tablo 2.5. Biyomalzemelerin Özellikleri [114] 29

Tablo 2.6. Biyomalzemelerin Kullanım Yerleri [115].....30

Tablo 2.7. Bazı metallerin mekanik özellikleri. 31

Tablo 2.8. İmplante Edilebilir Biyoseramiklerden Beklenen Özellikler [118] 32

Tablo 2.9. Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Seramikler [116]. 33

Tablo 2.10. Seramik Biyomalzemelerin Mekanik Özellikleri [116].....34

Tablo 2.11. HA'nın fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik özelikleri [139]. 43

Tablo 2.12. Bazı çözücülerin dielektrik özellikleri [186]. 50

Tablo 2.13. Biyouyumlu Malzemelerin Özellikleri [165].....54

Tablo 2.14. Mühendislik malzemelerinin sınıflandırılması [176].....58

Tablo 2.15. Hidroksiapatitin mekanik özellikleri.....64

Tablo 3.1. Yapılan deneysel çalışmaların akış şeması. 67

Tablo 3.2. Sentezlenen greftlerin konsantrasyon oranları.....69

Tablo 3.3. HA esaslı biyo-greftlerin karışım yüzde oranları.....70

Tablo 3.4. I ve II. gruptaki biyo-greftlerin sinterleme öncesi ve sonrası ağırlık ve yoğunlukları.....70

Tablo 3.5. Greft üretiminde kullanılacak olan sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu malzemelerinin öğütme şartları.....73

Tablo 3.6. Sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu malzemeleri kullanılarak üretilen alternatif biyo-greft sentez malzemelerinin yüzde oranları ve üretim şartları.....74

Tablo 3.7. Poroz yapıya sahip alternatif biyo-greftlerde kullanılan kimyasal bileşikler, oranları ve pH değerleri.....76

Tablo 4.1. Farklı pH değerlerine sahip biyo-greftlerin boyut analizi sonuçları 116

Tablo 4.2. Poroz yapıdaki (HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Esaslı) alternatif biyo-greftlerin %porozite sonuçları.....193

Tablo 4.3. Hidroksiapatit sentez biyo-greftlerinin basma testi sonuçları 196

Tablo 4.4. Hidroksiapatit esaslı biyo-greftlerin basma testi sonuçları 198

Tablo 4.5. HA esaslı sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu içerikli greftlerin basma deneyi sonucu maksimum gerilme ve maksimum kuvvet değerleri. 200

Tablo 4.6. Poroz yapıya sahip HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftlerin basma deneyi sonucu maksimum gerilme, maksimum kuvvet, %şekil değişimi ve elastoplastik enerji değerleri.....205

Tablo 4.7. I ve II. gruptaki biyo-greftlerin Vickers mikrosertlik değerleri 210

Tablo 4.8. Mikron ve nano boyutta HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı alternatif biyo-greftlerin mikrosertlik değerleri. 212

Tablo 4.9. Poroz yapıya sahip alternatif biyo-greftlerin Vickers mikrosertlik değerleri 215

Tablo 4.10. Dekalsifikasyon işlemi için hazırlanan kemik biyo-greftleri çözeltisinin %konsantrasyonu. 229

Tablo 4.11. İn vivo deneyi öncesi ve sonrası biyo-greftlerin ICP-MS sonuçları (Biyo-greft kodu -.Ö.= İn vivo deneyi öncesi, biyo-greft kodu-S.= İn vivo deneyi sonrası) 261

Tablo 4.12. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan üç nokta eğme deneyinde Maksimum Gerilme ve %Şekil Değiştirme değerleri 264

Tablo 4.13. H60 kodlu biyo-greftin L929 hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri 275

Tablo 4.14. H30Ca kodlu biyo-greftin L929 hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri 275

Tablo 4.15. H50Y10 kodlu biyo-greftin L929 hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri 275

Tablo 4.16. N1-7 kodlu biyo-greftin L929 hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri 275

Tablo 4.17. N1, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu biyo-greftlerin osteoblast hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri 277

Tablo 4.18. H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu biyo-greftlerin osteoblast hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri 277

Tablo 4.19. H30G20, H10G75, S30G20 ve S13G75 kodlu biyo-greftlerin osteoblast hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri 277

Tablo 4.20. L40G20, L10G75, B40G20 ve B10G75 kodlu biyo-greftlerin osteoblast hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim farkı değerleri 277

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kemik matrisin temel bileşenleri 13

Şekil 2.2. Kortikal ve trabeküler kemik için gerilme- zorlanma eğrisi. 15

Şekil 2.3. Kopma Dayanımının Şekil Değiştirme Hızıyla Değişimi Grafiği 17

Şekil 2.4. Çocuklarda görülen kırık tipleri. 18

Şekil 2.5. Kemiğin yüklenme durumları. 18

Şekil 2.6. Kemiğin eğilme yüklenmesi. 18

Şekil 2.7. Kemiğin kombine yüklenmesi. 19

Şekil 2.8. Tibia kırıklarında Chapman sınıflandırması [103]. 20

Şekil 2.9. Yükleme durumlarına göre kırık tipleri. 23

Şekil 2.10. Kırık kemikte callus oluşumu. İlk durumda 0.5 kat zayıfken kemik çapı 40 mm'ye ulaştığında 1.6 kat güçlüdür. 24

Şekil 2.11. İyileşme sonrası dönemlerde tekrar kırılma oluşturabilecek tork miktarı. 24

Şekil 2.12. Yeni biyomalzeme dizayn ederken göz önüne alınan faktörler[55]. 28

Şekil 2.13. Biyoaktivitelerine göre biyoseramiklerin sınıflandırılması. 35

Şekil 2.14. Bazı kitin kaynaklarında kitinin yeri [134]. 40

Şekil 2.15. HA'in şematik olarak gösterimi [139]. 42

Sekil 2.16. Hidroksiapatit oküler implant uygulanması [158]. 47

Sekil 2.17. Çeşitli türde yapay gözler [159]. 47

Şekil 2.18. İnce film oluşumunda işlem basamaklarını gösteren akış diyagramı [185]. 52

Şekil 3.1. Ultrasonik homojenizasyon işlemi 69

Şekil 3.2. I ve II. gruptaki biyo-greftlerin sinterleme öncesi ve sonrası yoğunluk grafikleri. 71

Şekil 3.3. III. Grup biyo-greftlerin üretiminde kullanılan (a) mikron ve (b) nano boyuttaki HA tozlarının SEM görüntüleri. 71

Şekil 3.4. III. Grup biyo-greftlerin üretiminde kullanılan mikron boyuttaki HA tozlarının XRD spektrumu 72

Şekil 3.5. III. Grup biyo-greftlerin üretiminde kullanılan nano boyuttaki HA tozlarının XRD spektrumu 72

Şekil 3.6. (a) Sübye, (b) Sübye kemiği ve (c) Yumurta kabuğu resimleri. 73

Şekil 4.1. Farklı pH değerlerine sahip HA sentez-numunelerinin [N1-5 (pH=5), N1-7 (pH=7), N1-9 (pH=9) ve N1-12 (pH=12)] FTIR spektrumları 81

Şekil 4.2. H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR analiz spektrumları 82

Şekil 4.3. Havanda ve mekanik öğütme sonrası yumurta kabuğu tozlarından alınan FTIR spektrumları.....84

Şekil 4.4. Havanda öğütme sonrası lületaşı tozlarından alınan FTIR spektrumları. 84

Şekil 4.5. Havanda ve mekanik öğütme sonrası sübye kemiği tozlarından alınan FTIR spektrumları.....85

Şekil 4.6. Mikron (a) ve nano (b) boyutta HA esaslı ve sübye kemiği katkılı alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları. 86

Şekil 4.7. Mikron (a) ve nano (b) boyutta HA esaslı ve lületaşı katkılı alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları. 87

Şekil 4.8. Mikron (a) ve nano (b) boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları. 88

Şekil 4.9. B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları.....89

Şekil 4.10. H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları.....90

Şekil 4.11. S30G20, S30G30, S30G40 ve S13G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları.....91

Şekil 4.12. L40G20, L40G30 ve L10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları 92

Şekil 4.13. Farklı pH değerlerine sahip HA sentez-numunelerinin [N1-5 (pH=5), N1-7 (pH=7), N1-9 (pH=9) ve N1-12 (pH=12)] ve standart HA'in [269] XRD spektrumları 93

Şekil 4.14. H60 kodlu alternatif biyo-greftin XRD spektrumu. 94

Şekil 4.15. H30Ca kodlu alternatif biyo-greftin XRD spektrumu.....95

Şekil 4.16. H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftin XRD spektrumu 96

Şekil 4.17. M-H30L20, M-H30L30 ve M-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları.....97

Şekil 4.18. M-H30Y20 ve M-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları 98

Şekil 4.19. M-H30S20, M-H30S30 ve M-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları.....98

Şekil 4.20. N-H30L20, N-H30L30 ve N-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları.....99

Şekil 4.21. N-H30Y20, N-H30Y30 ve N-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları.....100

Şekil 4.22. N-H30S20, N-H30S30 ve N-H30S40 kodlu alternatif biyo - greftlerin XRD spektrumları.....101

Şekil 4.23. H40ZrYt kodlu alternatif biyo-greftin XRD spektrumu 102

Şekil 4.24. H30G20, H30G30 ve H30G40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları 103

Şekil 4.25. L40G20, L40G40 ve L10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları.....104

Şekil 4.26. S30G20, S30G40 ve S13G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları 105

Şekil 4.27. B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları 106

Şekil 4.28. N1-12 kodlu HA sentez numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri. (a) X250, (b) X1000, (c) X5000, (d) X10 000. 107

Şekil 4.29. N1-12 kodlu biyo-greftin X250 büyütmeden alınan EDX spektrumu 108

Şekil 4.30. pH=5 olan N1-5 kodlu HA sentez numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü (a)X250, (b)X5000, (c)X10000, (d)X15000 109

Şekil 4.31. N1-5 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede (A) ve X15000 büyütmede (B) alınan EDX spektrumları.....110

Şekil 4.32. pH=7 olan N1-7 kodlu HA sentez numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü (a) X250, (b) X5 000, (c) X20 000.....111

Şekil 4.33. N1-7 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede EDX spektrumu.....112

Şekil 4.34. pH=9 olan N1-9 kodlu HA sentez numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü, (a) X1 000, (b) X15000. 113

Şekil 4.35. N1-9 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak (A) ve apatit taneleri üzerinden alınan (B) EDX spektrumları 114

Şekil 4.36. HA sentez numunelerinin X5000 büyütmede boyut analizinin yapıldığı yüzey görüntüleri, (a) N1-12, (b) N1-5, (c) N1-7, (d) N1-9 kodlu biyo-greftler. 115

Şekil 4.37. H60 kodlu biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri 117

Şekil 4.38. H60 kodlu biyo-greftin X250 büyütmedeki EDX spektrumu 118

Şekil 4.39. H30Ca kodlu biyo-greftin (a) X1000, (b) X5000, (c) X20 000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri 119

Şekil 4.40. H30Ca kodlu biyo-greftin X250 büyütmede EDX spektrumu.....120

Şekil 4.41. H50Y10 kodlu biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X3500, (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri. 121

Şekil 4.42. H30Y10 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede (A) ve X3500 büyütmedeki (B) EDX spektrumları.....122

Şekil 4.43. N-H30S20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X1000, (b) X5000, (c) X 10 000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü.....123

Şekil 4.44. N-H30S20 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak(A) ve apatit taneleri üzerinden (B) alınan EDX spektrumları.....125

Şekil 4.45. N-H30S30 kodlu biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000, (d) X 15 000, (e) X15 000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....126

Şekil 4.46. N-H30S30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak(A) ve X15 000 büyütmede apatit tanesi üzerinden(B) alınan EDX spektrumları.....128

Şekil 4.47. N-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü.....129

Şekil 4.48. N-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmedeki EDX spektrumu 130

Şekil 4.49. M-H30S20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....131

Şekil 4.50. M-H30S20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 (A) ve X10 000 (B) büyütmedeki EDX spektrumları.....133

Şekil 4.51. M-H30S30 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X1000, (b) X5000, (c) X10 000, (d) X20 000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....134

Şekil 4.52. M-H30S30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 (A) ve X20 000 (B) büyütmelerdeki EDX spektrumları 135

Şekil 4.53. M-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X1000, (b) X10 000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....136

Şekil 4.54. M-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmeden alınan EDX spektrumu...137

Şekil 4.55. M-H30L20 kodlu biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....138

Şekil 4.56. M-H30L20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmeden alınan EDX spektrumu...139

Şekil 4.57. M-H30L30 kodlu alternatif biyo-greftin(a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....140

Şekil 4.58. M-H30L30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....141

Şekil 4.59. M-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....142

Şekil 4.60. M-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....143

Şekil 4.61. M-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede apatit tanesi üzerinden alınan EDX spektrumu.....143

Şekil 4.62. N-H30L20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....144

Şekil 4.63. N-H30L20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu 145

Şekil 4.64. N-H30L30 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....146

Şekil 4.65. N-H30L30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu. ...147

Şekil 4.66. N-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....148

Şekil 4.67. N-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu 149

Şekil 4.68. M-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000 ve (d) X40000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....150

Şekil 4.69. H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....151

Şekil 4.70. M-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede apatit taneleri üzerinden alınan EDX spektrumu.....152

Şekil 4.71. M-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....153

Şekil 4.72. M-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu 154

Şekil 4.73. M-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....155

Şekil 4.74. M-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX analiz spektrumu.....156

Şekil 4.75. N-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....157

Şekil 4.76. N-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....158

Şekil 4.77. N-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede apatit taneleri üzerinden alınan EDX spektrumu.....159

Şekil 4.78. N-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....160

Şekil 4.79. N-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu....161

Şekil 4.80. N-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....162

Şekil 4.81. N-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu....163

Şekil 4.82. H40ZrYt kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....164

Şekil 4.83. H40ZrYt kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....165

Şekil 4.84. H30G20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X2000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....166

Şekil 4.85. H30G20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede yüzeyinden alınan EDX spektrumu.....167

Şekil 4.86. H30G30 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....168

Şekil 4.87. H30G30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....169

Şekil 4.88. H30G40 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X2000, (c) X5000 ve (d) X10000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....170

Şekil 4.89. H30G40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....171

Şekil 4.90. H10G75 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....172

Şekil 4.91. H10G75 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....173

Şekil 4.92. S30G20 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X1000, (c) X2000 ve (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü.....174

Şekil 4.93. S30G20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....175

Şekil 4.94. S30G30 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X150, (b) X250 ve (c) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....176

Şekil 4.95. S30G30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....177

Şekil 4.96. S13G75 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü.....178

Şekil 4.97. S13G75 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.....179

Şekil 4.98. L40G20 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X1000, (c) X2000, (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....180

Şekil 4.99. L40G20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmedeki EDX spektrumu.....181

Şekil 4.100. L40G30 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X500, (b) X1000, (c) X2000 ve (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....182

Şekil 4.101. L40G30 kodlu alternatif biyo-greftin EDX spektrumu.....183

Şekil 4.102. L40G40 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri 184

Şekil 4.103. L40G40 kodlu alternatif biyo-greftin EDX spektrumu 185

Şekil 4.104. L10G75 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri 185

Şekil 4.105. L10G75 kodlu alternatif biyo-greftin EDX spektrumu 186

Şekil 4.106. B40G20 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X100 ve (b) X250 büyütmelerdeki SEM görüntüleri 187

Şekil 4.107. B40G20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu 188

Şekil 4.108. B20G50 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X1000, (c) X2000 ve (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü 189

Şekil 4.109. B20G50 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu 190

Şekil 4.110. B10G75 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X1000 ve (c) X2000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri 191

Şekil 4.111. B10G75 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu 192

Şekil 4.112. Poroz yapıdaki (HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Esaslı) alternatif biyo-greftlerin %porozite sonuçları. 193

Şekil 4.113. HA sentez biyo-greftlerinin [N1-5 (pH=5), N1-7 (pH=7), N1-9 (pH=9) ve N1-12 (pH=12) kodlu] basma deneyi sonucu Gerilme-%Şekil Değişimi grafiği 197

Şekil 4.114. H60 (a), H50Y10 (b) ve H30Ca (c) kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi Gerilme-%Şekil Değişimi grafikleri 198

Şekil 4.115. Mikron boyutta HA esaslı alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrileri (a) M-H30L20, M-H30L30, M-H30L40 kodlu biyo-greftler, (b) M-H30S20, M-H30S30, M-H30S40 kodlu biyo-greftler, (c) M-H30Y20, M-H30Y30, M-H30Y40 kodlu biyo-greftler. 201

Şekil 4.116. Nano boyutta HA esaslı alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrileri (a) N-H30L20, N-H30L30, N-H30L40 kodlu biyo-greftler, (b) N-H30S20, N-H30S30, N-H30S40 kodlu biyo-greftler, (c) N-H30Y20, N-H30Y30, N-H30Y40 kodlu biyo-greftler. 203

Şekil 4.117. H40ZrYt kodlu alternatif biyo-greftin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrisi 206

Şekil 4.118. H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrileri. 206

Şekil 4.119. S30G20, S30G30, S30G40 ve S13G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-% Şekil Değişimi eğrileri 207

Şekil 4.120. L40G20, L40G30, L40G40 ve L10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrileri 208

Şekil 4.121. B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-% Şekil Değişimi eğrileri.....209

Şekil 4.122. H60, H30Ca, H50Y10, N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu biyo-greftlerin mikrosertlik grafigi. 211

Şekil 4.123. HA esaslı ve farklı konsantrasyonlarda yumurta kabuğu, lületaşı ve sübye kemiği katkılı alternatif biyo-greftlerin (a) Kendi içlerinde ve (b) Birbirleri arasında yapılan Vickers mikrosertlik karşılaştırma grafiği. 213

Şekil 4.124. HA esaslı ve farklı konsantrasyonlarda jelatin katkılı alternatif biyo-greftlerin Vickers mikrosertlik karşılaştırma grafiği. 215

Şekil 4.125. H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin delik açılarak yapılan in vivo deneyleri sırasında ki operasyon görüntüleri.....218

Şekil 4.126. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklerin boş bırakıldığı kontrol grubunun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c) 60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. .219

Şekil 4.127. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere ticari greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) ameliyat günü, (b)30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 220

Şekil 4.128. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere H60 kodlu alternatif biyo-greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) ameliyat günü, (b) 30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 221

Şekil 4.129. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere H30Ca kodlu alternatif biyo-greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) ameliyat günü, (b) 30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 223

Şekil 4.130. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere H50Y10 kodlu alternatif biyo-greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b)30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 224

Şekil 4.131. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere N1-7 kodlu alternatif biyo-greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c) 60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 226

Şekil 4.132. Histopatolojik incelemeler öncesi yapılan numune ön işlem hazırlığının şematik görüntüsü. (a) Greftler yerleştirilmiş kemik, (b) El testeresiyle numunelerin tibiadan (kesit) ayrılması, (c) Kemiğin neşter ve çekiçle ikiye ayrılması. 228

Şekil 4.133. Histopatoloji numunelerinden kesitler alan LEICA marka mikroton cihazı.....229

Şekil 4.134. Ticari greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu 232

Şekil 4.135. H60 kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu 233

Şekil 4.136. H50Y10 kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu. 234

Şekil 4.137. H30Ca kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu. 235

Şekil 4.138. N1-7 kodlu greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu. 235

Şekil 4.139. Kontrol grubu kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu. 236

Şekil 4.140. N1-7 kodlu biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a)X50, (b) X100, (c) X250, (d) X1000, (e) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri....237

Şekil 4.141. N1-7 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınan (c) EDX spektrumu 239

Şekil 4.142. Kontrol grubunun in vivo deneyi sonrası (a) X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü....240

Şekil 4.143. Kontrol grubunun in vivo deneyi sonrası farklı bölgelerden alınan EDX spektrumu.241

Şekil 4.144. Ticari greft kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a) X150, (b) X250 ve (c) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü 242

Şekil 4.145. Ticari greft kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınan EDX spektrumu....243

Şekil 4.146. H60 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a)X150, (b) X250 ve (c) X750 büyütmelerdeki SEM görüntüsü....244

Şekil 4.147. H60 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası greft bölgesinden alınan EDX spektrumu....245

Şekil 4.148. H30Ca kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a)X250, (b) X1000, (c) X5000, (d) X10000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri. 246

Şekil 4.149. H30Ca kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınan EDX spektrumu....247

Şekil 4.150. H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a)X100, (b)X250 ve (c)X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri....248

Şekil 4.151. H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınanEDX spektrumu....249

Şekil 4.152. Ticari greft, H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinin operasyon görüntüleri. 251

Şekil 4.153. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde kontrol grubunun (a) operasyon günü, (b)30 gün sonra, (c) 60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 253

Şekil 4.154. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde ticari greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) ameliyat günü, (b)30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 254

Şekil 4.155. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde H60 kodlu alternatif biyo-greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 255

Şekil 4.156. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde H30Ca kodlu alternatif biyo-greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b)30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 257

Şekil 4.157. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde H50Y10 kodlu alternatif biyo-greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c) 60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 258

Şekil 4.158. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde N1-7 kodlu alternatif biyo-greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri. 260

Şekil 4.159. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneyi sonrası, (a) Uygulanan eğme testi ve (b) Eğme testi sonucu kemikteki kırık bölgesinin görüntüsü 263

Şekil 4.160. Ticari greft, kontrol, H50Y10, H60, H30Ca ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin yerleştirildiği kemiğin in vivo deneyi sonrası üç nokta eğme testi sonucu elde edilen Gerilme-%Şekil Değişimi grafiği. 265

Şekil 4.161. H50Y10 kodlu biyo-greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu 268

Şekil 4.162. N1-7 kodlu biyo-greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu 269

Şekil 4.163. H60 kodlu biyo-greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu 270

Şekil 4.164. H30Ca kodlu biyo-greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu 271

Şekil 4.165. Kontrol grubunun boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu 272

Şekil 4.166. Ticari greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu.....273

Şekil 4.167. Üretilen biyo-greftlerin L929 hücre kültürü kullanılarak yapılan sitotoksisite deney sonuçları: Yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) H60, b) H50Y10, c) H30Ca, d) N1-7.....276

Şekil 4.168. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) N1-12, b) N1-5, c) N1-7, d) N1-9. 278

Şekil 4.169. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) H60, b) H30Ca, c) H50Y10. 279

Şekil 4.170. Ticari (Onspine) greftinin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi.....280

Şekil 4.171. H40ZrYt kodlu biyo-greftin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi .281

Şekil 4.172. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) H30G20, b) H10G75. 281

Şekil 4.173. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canılılığının gün ve dozlara göre değişimi a) S30G20, b) S13G75. 282

Şekil 4.174. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) L40G20, b) L10G75. 283

Şekil 4.175. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) B40G20, b) B10G75. 283

ÖZET

Mühendisliğin, özellikle de malzeme, makine ve kimya mühendisliklerinin tıp biliminde kullanımı ile başlayan gelişmeler ve uygulamalar, biyomalzemelerde pek çok yeniliği de beraberinde getirmiştir. Yeni nesil biyomalzemeler, vücuttaki fonksiyonel dokuların tamir ve değişimine imkân vermektedir. Özellikle kemiğin ana bileşen malzemesi olarak kalsiyum fosfat esaslı hidroksiapatit, biyouyumluluğu nedeniyle canlı vücutda deforme olmuş sert doku (kemik) onarımında, kemik-implant integrasyonunu iyileştirilmesinde ve kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır. Kemik dokusunun bazı özellikleri hidroksiapatitin mekanik özelliklerine benzer olduğu için hidroksiapatit esaslı kemiğin kimyasal yapısına benzer greftler üretilerek, mukavemet özellikleri iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Bir biyomalzemeden beklenen özellikler, biyofonksiyonellik, biyouyumluluk ve mekanik özelliklerin yanı sıra, gözenekli yapıda üretilebilmesi, hafif olması ve hücresel beslenme kabiliyeti olarak sınıflandırılabilir. Yapay greft malzemeler, sahip oldukları bu özelliklerden dolayı ayrı bir önem kazanmaktadır.

Bu çalışma 4 ana gruba ayrılmıştır. I. grupta kemiğin esas bileşen malzemesi olan hidroksiapatiti (HA), ticari HA'den daha ekonomik olarak üretmek için $Ca(OH)_2$ ve fosforik asit kullanılmıştır. Hazırlanan greft süspansiyonlarının pH'larının jelleşme, sinterleme ve mekanik özellikler üzerine etkilerini incelemek amacıyla farklı pH'larda jel greftler üretilmiş ve pH'ın üretilen greftler üzerinde mekanik ve morfolojik etkileri incelenmiştir. Bunun için pH değeri 12 olan greft süspansiyonuna NH_4OH tampon çözeltisi ilave edilerek pH değeri 5, 7, 9 olarak değiştirilmiş ve pH farkının kemik grefti üzerine etkileri incelenmiştir. II. grupta CaO, KH_2PO_4, P_2O_5, Na_2CO_3 gibi katkı malzemeleri içeren HA'i bileşenlerine ayırmadan, sinterlenebilirliği, biyoaktifliği ve biyouyumluluğu arttıran hidroksiapatit (HA) seramikler üretilmiştir. Sinterlenebilirliği arttırmak için ilave edilen malzemeler, sert doku ve biyoaktif camların (CaO) mineral bileşenlerinden seçilmiştir. Faz diyagramları araştırıldıktan sonra, HA'e ilave edilen malzemeler ($CaO\text{-}P_2O_5$ gibi), fizikokimyasal özelliklerine göre seçilmiştir.

Sol-jel yöntemiyle üretilen greftlerin, hasarlı canlı kemiğin onarımı üzerine etkilerini incelemek için Yeni Zelanda tavşanları kullanılarak in vivo deneyleri yapılmıştır. III. grupta üretilen greftlerde ise farklı oranlarda ve tane boyutlarında öğütülen sübye kemiği (cuttle fish), lületaşı (sepiyolite) ve yumurta kabuğu (eggs shell) tozu ilave edilerek elde edilen doğal greft ürünlerin sinterlenebilirlik, morfolojik ve mekanik özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. IV. grupta, üretilen poroz greft malzemelerde porozitenin etkilerini incelemek için; HA, lületaşı, sübye kemiği ve biocam esaslı CaO, KH_2PO_4, P_2O_5, Na_2CO_3 ve jelatin içerikli alternatif biyo-greftler yine sol-jel yöntemiyle üretilmiştir. Böylece poroz olarak üretilen kemik greftlerinin biyouyumluluk, morfolojik ve biyomekanik özellikleri incelenmiş ve II ve III. gruptaki alternatif biyo-greftlerle

karşılaştırılmıştır. Daha sonra sinterlenebilirliği arttırmak için HA'e ilave edilen katkı malzemelerinin alternatif biyo-greftlerin kimyasal özellikleri ve faz dönüşümlerine etkilerini incelemek için XRD ve FTIR analizleri ve yapısal morfolojilerindeki değişimi göstermek amacıyla SEM analizleri yapılmıştır. Ca/P oranı 1,67 olacak şekilde ilave edilen sinter malzemelerinin HA'nin densifikasyonuna, faz kompozisyonuna, tane büyümesine ve kırılma davranışına etkileri incelenmiştir. I ve II. grupta üretilen biyo-greftlerin biyouyumluluk ve toksik etkilerini incelemek amacıyla in vivo ve in vitro deneyleri yapılmış ve üretilen biyo-greftler ticari greft ve kontrol grubuyla kıyaslanmıştır.

Yapılan incelemeler sonucu, I. grupta $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ ve fosforik asit kullanılarak HA üretildiği FTIR ve XRD sonuçlarında görülmektedir. Ayrıca ürettiğimiz HA sentez biyo-greftinin pH değeri 5 ile 12 arasında bir değer olacak şekilde değiştirildiğinde, pH farklılığının greftin morfolojik ve mekanik özelliklerini değiştirdiği gözlenmiştir. pH değeri düştükçe greftin sinterlenebilirliğinin arttığı taneler arasındaki boşlukların azaldığı ve pH değeri 5 olduğunda ise taneler arasında hiçbir boşluğun oluşmadığı gözlenmiştir. Fakat pH değerinin düşmesi sonucu greftin gevrekliğinin arttığı ve mekanik özelliklerin düştüğü belirlenmiştir. II. grupta; HA'e ilave edilen KH_2PO_4'ün HA in densifikasyonunu arttırmadığı, fakat Na_2CO_3'ın HA'in densifikasyonunu önemli derecede arttırdığı görülmüştür. Ayrıca HA'e ilave edilen Yttria bileşiğinin HA'in sertliğini ve basma dayanımını arttırdığı tespit edilmiştir. I ve II. grup ile yapılan in vivo ve in vitro deneyleri sonucu, defektleri doldurmak için kullanılan biyo-greftlerin kontrol grubuna göre kemiklerin iyileşmesini hızlandırdığı belirlenmiştir. Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA sentez biyo-greftinin in vivo ve in vitro deney sonuçlarının ticari grefte yakın olduğu, fakat HA'e ilave ettiğimiz CaO ve Yttria gibi bileşiklerin kemik defekt onarımını arttırdığı ve ürettiğimiz hiçbir biyo-greftin toksit etki göstermediği tespit edilmiştir. III. grupta HA'e farklı oranlarda sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu gibi doğal ürünlerin ilave edilmesi sonucu üretilen biyo-greftlerin genel olarak jelleşebilirlik, sinterlenebilirlik ve mekanik özelliklerinin arttığı görülmüştür. IV. grupta HA, sübye kemiği ve lületaşı esaslı biyo-greftlere farklı oranlarda jelatin ilave edilerek poroz yapı elde edilmeye çalışılmış ve bu poroz yapının greftin mekanik özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuçta, poroz yapının elde edildiği ve genel olarak jelatin miktarı arttıkça por miktarı ve çapının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca por miktarı arttıkça basma ve sertlik dayanımlarının düştüğü gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hidroksiapatit, pH etkisi, Alternatif biyoseramikler, Biyouyumluluk, Porozite.

ABSTRACT

The Production of Bone Bio-Grafts and in Vivo/ in Vitro Biocompatibility-Bio Mechanical Analysis

The latest advances and applications involving adaption of medical science with materials and Bioengineering has brought about many innovations. The new generation of biomaterials now make it possible to repair and change the functional tissues of the human body. Because of the biocompatibility of Hydroxyapatite which is based on calcium phosphate, it can be used to repair cracks, deformed and broken bones. It can improve the integration of bone-implants and can be used as a coating material. Because of the similarity between the properties of bone tissue and the mechanical properties of hydroxyapatite (HA), it's strength properties which are similar to the chemical structure of hydroxyapatite-based bone, can be used to improve the sucess of grafts. The expected properties of a biomaterial are: biocompatibility, specific mechanical properties, porisity, and to be light enough to have the ability of allowing cellular nutrition. In this respect, artificial graft materials have a major significance because of what they offer for a success in terms of biocompatibility as well as low cost.

This study is divided into four main groups. In Group I: $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, phosphoric acid was used to produce more econonomical HA which is the main component of bone material derived from commercial HA. In order to examine the effects of pH on gelation, sintering and mechanical properties, gel grafts were produced at different temperatures. The mechanical and morphological effects of pH produced grafts were then studied. When the compound HA was in a gel form the pH value was changed from 12 to 5, 7, 9 by adding a NH_4OH buffer solution. In Group II; HA based ceramics was fabricated by using the biocompatible inorganic chemicals e.g CaO, KH_2PO_4, P_2O_5, Na_2CO_3.

The effects of the differences of the pH was investigated on HA. Hydroxyapatite ceramics enhances sinterability, bioactivity and biocompatibility were produced without separating the components of the HA. This included adding Na_2CO_3, CaO, KH_2PO_4, P_2O_5. Material additives were selected from the mineral components of hard tissue and bioactive glass (CaO) to increase sinterability. After phase diagrams were studied, the materials added to HA (such as $CaO\text{-}P_2O_5$), were chosen according to their physicochemical properties.

In vivo experiments concerning grafts produced by the sol-gel method were performed using New Zealand rabbits to examine the effects on repaired or damaged bone tissue. The grafts produced in Group III were obtained by the addition of cuttle fish, sepiyolit, and egg shell powder and were granulated at different rates. The particle sizes were studied in regards to the effects on

sinterability, morphological and mechanical properties. In Group IV; the alternative bio-grafts which contained HA, sepiyolit, cuttle fish and bioglass based CaO, KH_2PO_4, P_2O_5, Na_2CO_3 and gelatin were produced by using the sol-gel method to examine the effects of the porosity in the porous graft materials. Alternative bio-grafts were produced in Group IV and compared with bio-grafts in Groups II and III. All study produced bio-grafts were compared with commercially available graft material as well as the control group. XRD and FTIR analysis was performed in regards to the effects on chemical properties and phase transformations of the bio-grafts which was obtained by the introduction of additives to HA to increase the sinterability. SEM analyzes were used to show the changes of the structural morfological. Sintered materials were added (Ca / P ratio to be 1. 67) to study the effects of densification, phase composition, grain growth and fracture behavior of HA.

As a result of the study, the results presented in Group I, FTIR, and XRD show that HA was produced by using Ca $(NO_3)_2.4H_2O$, and phosphoric acid. When the pH value was changed in the 5 to 12 range, it was noted that the pH differences changed the morphological and mechanical properties of the graft. Along with lowering the value of the acid concentration, it should be noted that the gaps between the grains decreased and showed an increase in graft sinterability. When the pH value was 5 no gaps between the grains were observed. As a result of the decrease in the pH value, it was shown that the brittleness of the graft increased and the mechanical properties decreased. KH_2PO_4 which was added in HA did not increase the densification of HA but Na_2CO_3 caused an increase in densification of HA. It was determined that the Yttria compound be added to HA to increase the hardness and compressive strength of HA. This is the result of *in vivo* and *in vitro* experiments found in Groups I and II. It was shown that the bio-grafts that were used to fill defects acceleraterated the healing of bones more than that of the control group. The results of *in vivo* and *in vitro* experiments of the bio-grafts produced with the sol-gel methods were found to be close to the commercial graft. However, by adding CaO and Yttria in HA increased the bone defect repair, and it was demonstrated from in vitro and in vivo experiment that the produced bio-grafts did not show any toxic effects. In Group III, the first time, biografts was produced by the addition of natural products into HA. Different rates of cuttle fish back bone, eggs shell and sepiolite generally increased the sinterability and so mechanical properties. In Group IV, this study attempted to obtain a porous structure by adding different amounts of gelatin into HA, cuttle fish bone and sepiyolit-based bio-gelatin. The porous structure have been obtained and was examined in regards to the effects on the mechanical properties of the graft. From SEM analysis, It was demonstrated that the amount and diameter of pores increased with the increased amount of gelatin.

Keywords: Hydroxyapatite, The influence of pH, Alternative bioceramics, Biocompatibility, Porosity.

SİMGELER

s : Gerilme

F : Kuvvet

A : Alan

e : %Uzama

L : Uzunluk

E : Elastisite Modülü

V : Hacim

Vm : Matriks hacmi

N : Deneysel parametre

Eep : Elastoplastik Enerji

Kıc : Kırılma Tokluğu

KISALTMALAR

HA	: Hidroksiapatit
TCP	: Trikalsiyum fosfat
DCP	: Dikalsiyum fosfat
DCDP	: Dikalsiyum fosfat dihidrat
PE	: Poli etilen
PP	: Poli propilen
PVC	: Poli vinil klorit
PMMA	: Poli metil met akrilat
PEEK	: Poli eter eter keton
PTFE	: Poli tetra flor etilen (teflon)
PAN	: Poli akrilo nitril
PU	: Poli Üretan
HEMA	: Hidroksil etil meta krilat
BP	: Benzol peroksit
UHMWPE	: Ultra yüksek moleküler ağırlıklı poli etilen

1.GİRİŞ

Yaşayan vücutta hasar gören dokunun yerine yerleştirilen, organ ve dokuların işlevlerini kısmen veya tamamen yerine getirmek üzere üretilen ve kullanılan biyouyumlu malzemelere "biyomalzeme" denilmektedir. Bu malzemelerin; biyolojik yönden uyumlu olması, toksik ve kanserojen olmaması, kimyasal açıdan inert ve stabil olması, yeterli dayanıma sahip olması, uygun ağırlık ve yoğunlukta olması, üretiminin kolay olması ve ekonomik olması arzu edilmektedir. Biyomalzemelerin; fiziksel, kimyasal, mekanik, termal özelliklerinin iyi bilinmesi ve doku ile alerjik, toksik, kanserojen reaksiyon vermemesi gerekir[1]. Biyoaktiflik ve biyouyumluluk özelliklerine sahip olan biyoseramikler bu reaksiyonları vermediği için yaygın bir şekilde biyomalzeme olarak kullanılmaktadır.

Biyoseramikler, travma, kemik enfeksiyonları ve cerrahi müdahalelerle yapılan implantasyon işlemleri sırasında oluşan kemik defektlerini veya savaş ve kazalarda zarar gören kemiği tedavi etmek için kullanılan biyouyumlu malzemelerdir. Bu malzemeler yüksek korozyon direncine sahip olduklarından ve vücut içerisinde kararlı halde bulunduklarından biyoinert malzemeler olarak sınıflandırılırlar. Kalsiyum fosfatlar ve biyocamlar gibi biyoseramik malzemeler, inertlik özelliklerinin yanı sıra, vücut tarafından kendi dokusu gibi algılanarak iyileşmeyi hızlandırıcı bir etkiye sebep olduklarından biyoaktif malzemeler olarak değerlendirilirler. Kalsiyum fosfatlar gerek elementel kompozisyonu gerekse kemik ve dişte bulunan minerallerle büyük benzerlik göstermeleri ve vücut içerisinde yüksek biyouyumluluğa sahip olmalarından dolayı kalsiyum fosfat içerikli biyoseramiklerin biyomalzeme olarak yoğun bir şekilde tıpta sert ve yumuşak doku uygulamalarında kullanılmaktadır. Ancak, kalsiyum fosfatların kırılma tokluklarının düşük olmaları veya mekanik özelliklerinin zayıflığından dolayı aşırı yüklere karşı dayanıksız olmaları yüzünden daha çok yük taşınması gerekmeyen bölgelerde kullanılmaları daha uygundur.

Kalsiyum fosfatlar içerisinde en öne çıkan biyomalzemeler ise hidroksiapatit (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) ve üç-kalsiyum fosfattır (TCP, $Ca_3(PO_4)_2$). Bunlardan HA, yüksek biyouyumluluğu, vücutta yavaş bozunması, kimyasal yapısının kemik mineraline en çok benzerlik göstermesinden dolayı önemlidir, ancak TCP vücut içinde yüksek bozunma hızına sahiptir. HA'nın zayıf olan mekanik özelliklerini güçlendirmek ve biyolojik özelliklerini daha yüksek seviyelere çıkartmak amacı ile nano partikül boyutta HA ile yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Bu şekilde biyouyumluluk, mikroyapı ve mekanik özellikleri iyileştirilmiş daha ekonomik ve biyouyumlu alternatif kemik greftleri ve implant malzemeleri üretmek önemli bir amaç ve çalışma alanı haline gelmiştir.

Canlı vücuda implant yerleştirme operasyonları pahalı, zaman alıcı ve zor olduğundan vücut içinde uzun ömürlü ve en uygun nitelikte malzemeler kullanmak gerekmektedir. Ortopedik uygulamalarda kullanılan yapay implantların, en uygun mukavemete sahip, biyouyumlu metallerden veya alaşımlardan en ekonomik şekilde üretimi için çeşitli malzemeler ve üretim yöntemlerinin kullanıldığı bazı çalışmalar mevcuttur[1-10]. Toz metalurjisinde tane boyutu kontrolü ile mekanik özelliklerin kontrol edilebilmesi ve çoğu zaman döküm malzemelerinden daha iyi fiziksel ve mekanik özellikler elde edilebilmesi önemli bir amaç haline gelmiştir. Toz metalurjisi (T/M) ve döküm yöntemi ile üretilen biyomalzemeler birbiriyle karşılaştırıldığında, gözenekliliğin kontrol edilebilmesi ve yüksek ergime sıcaklığına sahip metallerin ergime sıcaklıklarının altında üretebilme imkanı T/M yöntemiyle üretimi cazip hale getirmektedir.

Sol-jel yöntemiyle üretilen bifazik kalsiyum fosfat (BCP) seramikler (farklı oranlarda HA ve β-TCP içerikli alternatif biyo-greftler) vücutta hasarlı bölgeye yerleştirildiğinde bölgede kemik dokusuyla güçlü bir bağ yapan fibroz bir aralığın oluşumuna izin veren greftlerdir. HA, stabil bir faza sahiptir, β-TCP ise daha hızlı eriyebilir bir malzeme olup vücutta kademeli olarak ayrışan bir yapıya sahiptir. β-TCP, ortama Ca ve P iyonları salarak yeni kemik oluşumunu sağlar ve β-TCP/HA oranına bağlı olarak kontrollü bir degredasyona uğrar. HA oranı düştükçe de degredasyon kabiliyeti artar [3]. Fakat düşük β-TCP içerikli BCP yapıda TCP nin çözünmesi ile mukavette de artış görülür [4]. Üretilen BCP lerde β-TCP/HA oranı ne olursa olsun TGA ölçümleri sonucu yapılarında su, kalojen ve kalsiyum fosfat gibi mineraller içerdiği görülmektedir. Yapılan in vivo ve in vitro deneyleri sonucunda; 12 hafta sonra yapıda önemli bağlar oluştuğu, HA'in por kenarlarında chandroid dokunun oluştuğu, in vitro deneyleri sonucuda makroporların kenarları arasındaki bağlardan osteoblastların geçtiği ve hızla büyüdüğü görülmüştür [4,5].

Doku mühendisliğinde kullanılan ideal poroz (scaffolds) yapılı kemik dokusu için yeni hücre oluşumunu sağlayarak, iyi osteoiletkenlik ve biodegradasyon, uygun mekanik özellikler, yüksek porozite yapısı (porozite> %90, >400-500 μm) ile düzensiz şekiller üretilebilmektedir[6-10]. İdeal scaffolds kriterlerine sahip olan biyoaktif camlar mükemmel osteoiletkenlik ve bioaktifliğe, yerleştirildiği yerde yeni hücre oluşturabilme özelliğine ve kontrol edilebilir biyodegredasyona sahip olduğu belirtilmiştir[11-19]. Kemik doku mühendisliği için cam-seramikden türetilmiş 45S5 biyocam, toz metalurjisi yöntemiyle şekillendirilip sinterlendikten sonra 510-720 μm boyutlarında poroziteye sahip scaffoldlar üretilmiştir. Daha sonra yapılan basma ve eğme mukavemeti deneyleri sonucu 45S5 biyocamın kemik kırıklarında kullanmak için mekanik yeterliliğe sahip, biyoaktif ve biyodegredasyona uygun malzemeler olduğu görülmüştür [20]. Biyocam ile yapılan in vivo deneylerinde ise: kemik altyapısı ve onarımı için malzemenin yeterli ve gerekli koşullara sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu malzemelerin vücutta bulunduğu bölgede geniş bir implant yüzeyi

oluşturduğu ve ameliyat bölgesinde iyi bir köprü görevi gören alternatif bir arayer malzemesi olduğu saptanmıştır [21].

Kemikler; dentin ve diş minesi, HA, protein, diğer organik maddeler ve su içeren doğal kompozit malzemelerdir. Kompozit malzemeler, içeriğinde bulunan bütün malzemelerin bazı özelliklerini tek bir malzemede topladığından dolayı, kullanıldığı kırık bölgesinde kemik dokusunun mukavemetinin yükseltilmesine de katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle kemik dokusunda bulunan kallojen, esnek yapısıyla HA'in gevrek kırılmasını önlerken, HA in kalojenden daha sert olması kallojenin plastik deformasyon bölgesine girerek hasara uğramasını önlemektedir [2]. İnsan kemiklerinin kortikal ve trabeküler kısımlarının matrisleri kalsiyum HA ve Trikalsiyum fosfat (TCP: $Ca_3(PO_4)_2$) olmak üzere iki fazdan oluşmaktadır. Asıl faz olan doğal kalsiyum HA, kortikal kemiklerde %50'den az olmamak üzere gözenekli bir yapı oluştururken trabeküler kemiklerde ise %75'in üzerinde gözenekliliğe sahip bir kafes yapısı oluşturmaktadır. İnsan kemiğindeki gözeneklerin boyutları, 100 ile 150 μm aralığında değişmekte olup doğal kemik iliğiyle doldurulmuştur. Son yıllarda, doğal kemikle aynı inorganik kompozisyonu veren HA mükemmel biyouyumluluğu ve dokuyla biyo-aktif özellik verdiği için yapay olarak üretilmeye başlanmıştır. Bu veriler doğrultusunda HA tozları sol-jel yöntemiyle üretilip, farklı sıcaklıklarda ve sürelerde sinterlenerek, bu farklılıkların HA üzerindeki etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu doğrultuda kalsiyum, fosfor, potasyum ve nitrat içerikli bileşikler kullanılarak sol-jel yöntemiyle çeşitli HA'ler üretilmiştir [22-28]. Bu çalışmalarda sinterleme ve yaşlanma sıcaklığına bağlı olarak nano boyutta tozların elde edildiği ve sıcaklığa bağlı olarak da kristalin derecesinin değiştiği görülmüştür. Sinterleme sıcaklığı arttıkça tane boyutunun arttığı, 700ºC de yapıda ikinci bir fazın oluşmadığı ve saflığının çok yüksek olduğu, 800ºC ve üstündeki sıcaklıklarda ise yapının dekompose olduğu tespit edilmiştir. TEM de bakıldığında 700ºC de yapıda malzemenin enerjisine katkı sağlayan nanopartiküllerle bağlantılı olarak geniş yüzey bölgelerine sahip aglomerasyon yapısının oluştuğu görülmüştür [22-25,28].

FTIR analizleri sonucu, yapıda karbonat piklerinin oluştuğu görülürken, XRD analizleriyle malzemede HA fazının oluştuğu ve üretilen HA tozunun çözülme oranının ticari HA'den yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca üretim sonrası oluşan karbonatlı bileşikler kemik yapısına benzer olduğundan dolayı HA'in biyoaktifliğinde hayati rol oynamaktadır. Ayrıca nanoyapıdaki HA boyutunun biyolojik apatite yakın olduğu ve sol-jel yöntemiyle üretim sonucu HA'den iyi biyorezorpsiyon elde edildiği yapılan incelemeler sonucunda belirtilmiştir [24,25]. Ca, nitrat ve fosfat içerikli bileşiklerle üretilen HA çözeltisinde konsantrasyon arttıkça kompakt yoğunluğunun arttığı ve bu nedenle HA'in kristal boyutunun azaldığı gözlenmiştir [26]. Yapılan bir diğer çalışmada, HA sentezi yapılırken farklı yüzde oranlarında etanol kullanılarak etkileri incelenmiştir. Bunun sonucunda etanol miktarı arttıkça nano boyutta (50-150 nm) ve amorf yapıda HA elde

edildiği tespit edilmiştir[27]. HA üretmek için amonyum bileşiği kullanıldığında, amonyumun HA oluşumunu hızlandırdığı belirlenmiştir. Ayrıca kalsinasyon sıcaklığı arttıkça tanelerinn küresel yapıdan lameller yapıya dönüştüğü ve Fosfor (P) kaybından dolayı Ca/P oranının yükseldiği görülmüştür [28].

Üretilen biyomalzemelerin pH ve sinterleme sıcaklığı değerindeki farklılığın ve uygun greft morfolojisinin kritik bir özellik olduğu bazı çalışmalarda bahsedilmiştir[29-32]. Düşük pH değerinde bütün biyomalzemenin bozunduğu ve kalsiyum fosfat çökeltisinin elde edildiği görülmüştür[29]. Biyomalzemelerin pH değerleri değiştirildiğinde, en büyük farklılık biyomalzemelerin morfolojisinden elde edilmiştir[30]. pH değeri 6 ve 9 olduğunda whisker yapı, pH=14 olduğunda ise küresel yapı gözlenmiştir. XRD sonuçları kıyaslandığında, pH değeri 6 ve 9 olduğunda piklerin dik olması iyi bir kristalin yapısı oluştuğunu gösterirken, pH değeri 14 olduğunda piklerin dik yapısının bozulduğu, daha geniş bir pik aralığının oluştuğu ve buna bağlı olarak düşük kristalin yapısının elde edildiği tespit edilmiştir[30].

Biyomalzemelerin üretiminde kullanılan bileşiklerin ve sinterleme sıcaklıklarının biyomalzemelerin kimyasal ve fiziksel özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir[31, 32]. Sonuçta; biyomalzeme üretmek için kullanılan bileşiklerin özelliklerine bakıldığında yüzey alanı azaldıkça ve partikül boyutu arttıkça pH değerinin azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan in vitro deneyi sonucu, numune yüzey bölgesinin ve partikül boyutunun artmasıyla toplam reaksiyon tabakasının kalınlığının ve in vitro deneyi için kullanılan SBF çözeltisinin pH değerinin azaldığı görülmüştür [31]. Diğer bir çalışmada ise, sinterleme sıcaklığındaki artış ile HA'in tane boyutunun arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca sinterleme sonrası biyomalzemelerin dekompozisyonu arttığından dolayı yoğunluk ve mukavemette de artış gözlenmiştir [32].

HA, mükemmel biyouyumluluğa ve insan kemiğinin kimyasal yapısına benzer bir yapıya sahip olduğundan dolayı tercih edilmektedir[33,34]. Fakat insan kemiğinin kırılma tokluğu 2-12 $Mpa.m^{1/2}$ iken, HA'in kırılma tokluğu yaklaşık 1 $Mpa.m^{1/2}$ 'i geçmemektedir[34,35]. Bu nedenle HA ağır yüklemeye maruz kalan yapay dişler ve kemikler de kullanılmamaktadır. HA tıp alanında büyük yük taşıyan implantların kaplanmalarında ve yine düşük yüke maruz kalan poroz implantlarda kullanılmaktadır[33,34]. Bu nedenle alternatif biyo-greft üretiminde HA'e K_2CO_3, Na_2CO_3, KF, sodyum fosfat, KH_2PO_4, H_3BO_3, KCl, $Na_2Si_2O_5$ gibi katkı malzemeleri ilave edilerek greft üzerindeki etkileri incelenmiştir[35-40]. Yapılan incelemeler sonucunda KH_2PO_4, H_3BO_3, KCl, $Na_2Si_2O_5$ sinter malzemelerinin HA'in densifikasyonunu arttırmadığı ve K_2CO_3, Na_2CO_3, KF, sodyum fosfat gibi bileşiklerin ise önemli derecede arttırdığı görülmüştür[35]. Ayrıca bütün sodyum fosfat bileşikleri HA'in sinterlenebilirliğini geliştirmiş ve HA ile zayıf arayüzey oluşturmamıştır[35]. HA'e CaO, P_2O_5, Na_2O ve Na_2CO_3 bileşikleri ilave edildiğinde mükemmel biyouyumluluk gösterdiği tespit edilirken mikrosertlikte, kırılma tokluğunda ve eğme

mukavemetinde artış sağladığı da gözlenmiştir [36-38]. Sinterleme sıcaklığı 1250 ve 1300ºC yapıldığında en iyi densifikasyon 1300ºC de 3 saat yapılan sinterlemede elde edilmiştir[37]. Sinterleme sıcaklığı düştükçe (1200 ve 1250ºC'de) porozite azalmış ve sinterleme sıcaklığı arttıkça β-TCP yapısı eğme mukavemetinin düşmesine neden olan α-TCP yapısına dönüşmüştür [38]. Sinterleme sıcaklığı 850ºC yapıldığında biyo-greftin yüzey difüzyonu arttığından dolayı densifikasyon oluşmaya başlamıştır[39]. İlave edilen sinter malzemesinin miktarı arttıkça greftin sert doku yerine kullanılabilirliği artmış ve bu malzemelerin en düşük miktarda bile ilave edilmesi ile mekanik özellikler gelişmiştir[40].

Son yıllarda yapılan birkaç araştırmada, bazı omurgasız deniz ürünleri doğal inorganik iskelet sistemini güçlendirmek için kullanılmıştır[41, 45-51]. Deniz ürünleri insan kemiğine olan yapısal benzerliğinden dolayı ve anjiyogenez (kılcal damar oluşumu) için gerekli olan yüksek makroporozite yapısına sahip olduğundan dolayı tercih edilmektedirler[41-44].

Mürekkep balığı kemiğinin ve sedef gibi diğer deniz canlılarının biominerilizasyon yapısının insan kemik yapısına benzemektedir[45]. Mürekkep balığı kemiğinin inorganik kısmı anizotropiktir(lameller gibi) ve bu yapı kalsiyum karbonatın ($CaCO_3$) mineralleşmiş poroz yapısından dolayı insan kemik yapısına benzemektedir. HA için kalsiyum karbonatın hidrotermal dönüşümü aşağıda gösterilen kimyasal eşitliğe göre meydana gelmektedir[46].

$$10CaCO_3 + 6(NH_4)_2HPO_4 + 2H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 6(NH_4)2CO_3 + 4H_2CO_3$$

HA; kemik ve diş gibi doğal kaynaklardan doğrudan ayrıştırılabildiği gibi, midye kabuğu, yumurta kabuğu veya kalsiyum içeren doğal olmayan başka malzemelerin fosfat bileşikleriyle reaksiyonu sonucu anorganik olarak da elde edilebilmektedir[47,48]. Mürekkep balığının $CaCO_3$ içerikli sırt kemiği, ideal bir por yapısına sahip olup osteoblast hücreleriyle yapılan in vitro testlerinde iyi biyouyumluluk özelliği göstermektedir. Ayrıca kemik-doku büyümesi ve vaskülerizasyon gibi biyolojik aktiviteler içinde uygun olup amonyak ve fosfat bileşikleriyle sentez edildiğinde kemiğe benzer kimyasal ve kristal yapı vermektedir [49,50]. Kemik defektlerinde sadece mürekkep balığının sırt kemiği kullanıldığında ve spongiyöz sığır kemiğiyle in vivo deneyi yapılarak kıyaslandığında, kemik onarımı açısından sığır kemiğinin daha iyi sonuç verdiği, fakat mürekkep balığı sırt kemiğinin ortopedik uygulamalarda alternatif bir malzeme olduğu belirlenmiştir[51].

HA sentezi için gerekli bileşiklerin seçilmesi dışında kullanılan tozların şekli, boyutu, miktarı, üretim yöntemi, sinterleme sıcaklığı bu özelliklerin tümünü etkiler. Sinterleme sıcaklığı arttıkça şekilsiz porların sayısı azalır ve küresel yapı oluşmaya başlar. Küresel yapı arttıkça kırılma tokluğu ve sertlik artar[49]. HA'in fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklerini sinterleme sıcaklığı dışında etkileyen en önemli özelliklerden biri de ilave edilen katkı malzemeleridir[52, 53]. Yapılan

incelemelerde, HA'e CaO, P_2O_5, Na_2O ve Na_2CO_3 gibi biyoseramiklerin ilave edilmesi sonucu, sertlik ve basma mukavemetinin arttırdığı gözlenmiştir[52, 54]. Ayrıca bu greftlere insan osteoblast hücresiyle (OPC-1) yapılan 7 günlük in vitro deneyi sonucu toksik özellik göstermediği ve SEM görüntülerinden OPC-1 scaffold çekirdeklerini oluşturduğu tespit edilmiştir[54].

Kemik oluşumunda kullanılan biyomalzemelerin üretiminde kritik rol oynayan bir diğer özellikte porozite yapısıdır. Doku mühendisliğinde kullanılacak olan ideal bir biyomalzemenin osteokondüktif, osteoindüktif ve hücre filtrasyonu için de poroz bir yapıya sahip olması arzu edilir. Ayrıca, biyouyumlu, biyobozunur ve doğal kemiğe yakın mekanik özellikler vermesi istenilen diğer özelliklerdir. Biyomalzemeleri hücre içeren ve içermeyen olarak ikiye ayırabiliriz. Hücre içermeyen biyomalzemeler genelde kemik hücrelerinin yapı içinde gelişimine olanak sağlayan katı, absorbe edilebilen boşluklara sahip biyobozunur ya da poroz yapılardan oluşur. Hücre içeren malzemeler ise canlı hücreler ile birlikte kullanmak amacı ile tasarlanmışlardır [55]. Kemik makro düzeyde kortikal (veya kompakt) ve kanseloz (veya trabeküler) olmak üzere iki bölüme ayrılır. Bu iki yapı yoğunluk ve porozite bakımından birbirinden ayrılırlar [56, 57]. Kortikal kemik sıkı tertiplenmiş, boşluk içermeyen bir dokudur ve maksimum 1.8 g/cm^3 yoğunluğa sahiptir. Kanseloz kemik dokusu ise gevşek, labirent veya bol boşluklu bir görünüme sahiptir. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Yetişkin bir bireyin iskelet sistemindeki kemiklerin % 80′i kortikal, % 20'si de kanseloz kemiklerden oluşmaktadır.

Kemikler yapısal olarak ikiye ayrıldığı gibi kemik matrisi de organik matris ve mineral maddeler olmak üzere iki bileşene sahiptir. Kemiğin ağırlıkça % 65'ini inorganik bileşenler, % 25'ini organik bileşenler ve % 10'unu su oluşturmaktadır[58]. Kemiğin organik matrisi % 90 oranında kolajen fibrilleri içerir. Geriye kalan % 10'luk kısım ise kolajen içermeyen proteinlerden (proteoglikan ve fosfolipidler gibi) oluşur[59].

Kemiğin morfolojik yapısından biri olan trabeküler kemik kortikal kemiğin etrafını sarmakta olup, 1mm çapa ve %50-90 oranlarında poroziteden meydana gelmektedir. Trabeküler kemiğin yoğunluk değeri 0,30±0,10 gr/cm^3'tür [60, 61]. Kortikal kemik %3-12 poroziteye sahip olup haversian kanallarıyla çevrelenmiştir. Ayrıca kortikal kemiğin yoğunluk değeri 1,85±0,06 gr/cm^3'tür [60, 62]. Kemiklerde 4 hücre tipi vardır. Bunlar, osteoblast, osteoklast, osteosit ve kemik astarı oluşturma hücreleridir (bone lining cells) [57]. Osteoblast yeni kemik matrisinin mineralizasyonunu ve oluşumunu sağlarken, osteosit matris oluşumunun devam etmesini ve osteoklastta matrisin resorbe olmasını sağlamaktadır. Kemik astarı oluşturma hücreleri, osteoblastların oluşmasını sağlayan hücrelerdir [57].

Yeni bir biyomalzeme üretirken göz önüne alınması gereken en önemli parametreler malzemenin biyolojik, tıbbî ve mühendislik özelliklerini uygun bir şekilde birbirleri ile

bütünleşebilmesidir. Biyomalzemelerin hazırlanma işlemi biyolojik ve yapısal özellikler açısından kompleks bir durumdur. Malzeme Bilimi ve Mühendislik dallarına düşen görev, hazırlanan malzemenin arzu edilen mekanik özelliklerini (bozunma hızı, şekillendirilme özelliği, yüzey morfolojisi ve porozitesi vb. gibi) kullanılacak dokunun özelliklerine göre uyarlayabilmektir[63]. Biyomalzemelerde porozite yapısının, boyutunun ve miktarının etkilerini incelemek üzeri yapılan incelemelerde, por boyutunun ve miktarının artması ile kemik oluşumunu sağlayan hücre miktarının arttığı, porozite arttıkça kemik oluşumunun kolaylaştığı ve mekanik özelliklerin azaldığı görülmektedir [63, 64]. Ayrıca en düşük por boyutu ~100µm olması gerektiği tespit edilirken, kemik oluşumu ve vaskülerizasyonun artması için en ideal por boyutununda >300µm olması önerilmektedir[63]. Biyomalzemelerde poroz yapıyı elde edebilmek için ana bileşen malzemelerinin dışında, poroz yapıyı oluşturan polimer malzemeler kullanılır. Eğer nanofibroz yapıda polimer kullanılırsa bu makroporlar arasında iyi bir bağlantı oluşturmasını, iyi bir mekanik özellik ve por arabağlantılarının daha kuvvetli olmasını sağlamaktadır[65,66]. Ayrıca nanofibröz polimer kullanılması doku rejenerasyonunu desteklemekte olup, mükemmel biyouyumluluk ve mekanik denge saglamaktadır [65,66]. Biyocama poroz özellik kazandırmak için ilave edilen kolojen, hyaluronik asit ve phosphaditylserine bileşikleriyle üretilen alternatif biyo-greftlerde poroz yapının elde edildiği görülürken, yapılan in vitro ve in vivo deneyinde bu alternatif biyo-greftlerin uzun kemiklerin defekt onarımını hızlandırmaktadır[67]. Nano boyutta biyoaktif cam seramiklere kitosan-jelatin ilave edilerek elde edilen biyo-greftin hücre infiltrasyonu için yeterli mikroporozitenin elde edildiği, degredasyonun azaldığı ve protein absorbsiyonunun, biyoaktifliğin ve hücreler arası bağın arttığı tespit edilmiştir [68].

HA, β-TCP ve kalsiyum fosfat gibi biyoseramiklere ilave edilen polimer bileşiklerin (jelatin, alginate, montmorillanite gibi) scaffolds yapının mekanik ve biyolojik özelliklerini geliştirdiği görülmektedir [69-76]. Biyomalzemelere biyoseramik bileşiklerin ilave edilmesi kitosan içerikli scaffoldsun resorbsiyon kinetiğini azaltırken, mekanik özellikleri arttırmaktadır [76]. Jelatin kolojenin bir türevi olup, kitosan gibi, HA ve β-TCP ile poroz yapıda alternatif biyo-greft üretilebilen bir malzemedir. Ayrıca jelatin ve kitosan gibi biyomalzemelerde hücre oluşumunu ve hücre göçünü arttırma özelliğine sahiptir [77]. Jelatinsiz ve %2-10 oranlarında jelatin içerikli sementlerin mekanik özellikleri kıyaslandığında ise, maksimum mukavemetin %2 jelatin içerikli sementte elde edildiği görülmüştür [78,79]. Ayrıca, jelatinsiz alternatif biyo-greftlere göre jelatin içerikli alternatif biyo-greft sementlerde mekanik yükün dağılımının daha homojen olduğuda tespit edilmiştir [79]. $CaCO_3$ içerikli mercandan elde edilen HA ile jelatin içerikli biyo-greftlerin 16 µm çapında kürelerden oluşan kristal bir yapıya sahip olduğu ve kemik onarımı ve rejenerasyonu için uygun bir malzeme olduğu belirlenmiştir [80]. Yapılan bir diğer çalışmada, poroz HA-jelatin kompozitinin kanal gibi poroz yapısına sahip olması basma mekanik özelliğini, elastik modülünü ve uzama miktarını arttırdığıda tespit edilmiştir [81].

Yapılan çalışmalarda, farklı doğal ve yapay bileşikler farklı oranlarda kullanılarak 4 farklı alternatif kemik biyo-grefti üretilmiştir. I. grupta; kalsiyum fosfat ve fosforik asit kullanılarak hidroksiapatit (HA) sentezi yapılmış ve bir ticari HA ile kıyaslanmıştır. Daha sonra pH değeri 12 olarak ölçülen HA sentez numunesinin pH'ı NH_4OH tamponu kullanılarak sırasıyla 5, 7 ve 9'a düşürülmüş ve pH farkının greftin kimyasal, fiziksel ve mekanik özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. II. Grupta; hidroksiapatite (HA) farklı oranlarda CaO, P_2O_5, KH_2PO_4 ve Na_2CO_3 gibi katkı malzemeleri ilave edilerek bu katkı malzemelerinin HA üzerine olumlu ve olumsuz etkileri incelenmiştir. III. grupta; HA bileşiğine II. grupta belirtilen katkı malzemeleriyle birlikte farklı oranlarda sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu gibi doğada kolayca bulunabilen kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat içerikli bileşikler ilave edilerek HA esaslı biyo-greftler üretilmiş ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğunun alternatif biyo-greftlerin jelleşme, sinterlenebilme, kimyasal, fiziksel ve mekanik özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. VI. grupta ise, HA, biocam, sübye kemiği ve lületaşı tozu esaslı bileşiklere farklı oranlarda jelatin ilave edilerek poroz yapı elde edilmeye çalışılmıştır. Bütün biyo-greftlerin SEM, XRD ve FTIR analiz sonuçları ile morfolojik ve kimyasal özellikleri incelenirken, sertlik ve basma deneyleri yapılarak da mekanik özellikleri kıyaslanmıştır. Ayrıca in vivo (I ve II. gruplar), in vitro (I, II ve IV. gruplara) deneyleri yapılarak üretilen alternatif biyo-greftlerin biyouyumluluk ve toksik özellikleri incelenmiştir. İn vivo deneyi için Yeni Zelenda tavşanları kullanılırken, in vitro deneyi içinde osteoblast ve L929 hücre kültürü kullanılmıştır.

Sonuçta; sol-jel yöntemiyle üretilen alternatif biyo-greftlerden HA sentez biyo-greftinin ticari greft ile benzer morfolojik, mekanik ve biyouyumluluk özellikleri verdiği ve daha uygun fiyatta ve daha kolay üretildiği gözlenmiştir. HA'e ilave edilen Yttria, CaO gibi farklı kimyasal bileşiklerin greftin mekanik özelliklerini arttırdığı belirlenmiştir. Farklı oranlarda sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu gibi doğal ürünlerin HA'in sinterlenebilirliğini, densifikasyonunu ve mekanik özelliklerini arttırdığı tespit edilmiştir. HA, sübye kemiği ve lületaşına ilave edilen jelatin bileşiğinin biyo-greftte poroz yapının elde edilmesini sağladığı ve jelatin miktarı arttıkça por boyutu ve miktarının arttığı gözlenmiştir. Por boyutu ve miktarı arttıkça da mekanik özelliklerin düştüğü belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Kemik doku mühendisliği, ortopedik cerrahî ile temel bilimler prensiplerinin birleşiminden oluşmuş disiplinler arası bir alan olup, kemik içindeki kırıkları tedavi edebilmek için uygun biyomalzemeleri inceleyen ve bu yapıların doku oluşumuna geliştirici ya da fonksiyonların iyileştirilmesinde katkıda bulunabilmesi için gerekli şartları araştıran mühendislik dalıdır [82] .

Kemik yaşayan bir yapı olup, biyokimyasal, hücresel ya da hormonal proseslerle birleşerek kendini yenileme özelliğine sahiptir [83]. Ancak, kemik üzerinde oluşmuş hasar, kritik bir büyüklüğün üstünde olursa kendini yenileyemez ve yara olarak kalır. Kemik doku mühendisliği yardımı ile yeni dokunun cerrahî müdahale ile hasarlı bölgeye köprü oluşturmasını sağlamak ve bu sayede doku yenilenmesi ile dokunun normal fonksiyonlarını koruyabilmek mümkündür.

Kemik bağlantılı hastalıklarda mekanik araçlar ya da yapay protezler yaygın olarak kullanılan tedavi araçlarıdır ama doku ya da organ fonksiyonlarını tedavi edebilmeleri ve ev sahibi doku ile bütünleşmeleri mümkün değildir [84]. Dünya üzerinde artan nüfusa paralel olarak kemik bağlantılı hastalıkların kazalar nedeniyle daha da yaygınlaştığı ve bu nedenle de cerrahî müdahalelerde kemik transplantasyonuna daha fazla ihtiyaç duyulduğu anlaşılmıştır. Son yıllarda İngiltere'de yaklaşık olarak 150.000 adet osteoporoz nedeniyle kırık vakası görülmüş ve bu vakaların büyük bir yüzdesi de hastalık ve ölümle sonuçlanmıştır. Amerika Birleşik Devletlerinde, yıllık olarak 450.000 adet kemik doku graft prosedürü kullanılmakta ve bu hastalara harcanan milli sağlık sigorta masrafı yıllık olarak 120 milyon doları geçmektedir [85]. Bu nedenlerden dolayı, kemik doku geliştirme yöntemleri büyük ölçüde önem kazanmıştır.

Kemik doku mühendisliğinde tedavi amacıyla genellikle vücuda ait olan hücreleri de içeren ve immün sistemi rahatsız etmeyecek özellikteki bir iskelet yapı vücuda yerleştirilir [86]. Ortopedik prosedürde kullanılan malzemeler çok çeşitli olup kırıkların onarımının iyileştirilmesinde, eklemlere yerleştirilmede, iskelet üzerindeki hasarların yeniden yapılanmasında ya da kemikteki boşlukların doldurulmasında kullanılırlar. Ortopedik kullanımda polimer, metal, kompozit esaslı malzemeler kullanılır. Kullanılan yapının yeni kemik doku oluşumunda rolü büyüktür. Bu iskelet sisteminin etrafını saran dokuda kemik oluşumunu hem azaltacak etki göstermemeli hem de ortama geçici olarak yerleştirilmiş olan kemik hücrelerine ya da ajanlarına karşı taşıyıcı görevi üstlenmelidir. Özetle iskeletin başlıca görevi; gelişmekte olan dokuya geçici bir yapı sağlamak ve böylece osteojenik hücrelerin ya tek başlarına ya da büyüme faktörü ile birleşerek etkin bir biçimde taşınmasını temin etmektir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak olan ideal bir biyomalzemenin osteokondüktif, osteoindüktif ve hücre filtrasyonu için de poroz bir

yapıya sahip olması arzu edilir. Ayrıca, biyouyumlu, doğal kemikle kıyas edildiğinde makul bir mekanik kararlılıkta ve biyobozunur olması da istenilen diğer özelliklerdir.

Biyomalzemeleri hücre içeren ve içermeyen olarak ikiye ayırabiliriz. Hücre içermeyen biyomalzemeler genelde kemik hücrelerinin yapı içinde gelişimine olanak sağlayan katı, absorbe edilebilen boşluklara sahip biyobozunur ya da poroz yapılardan oluşur. Hücre içeren malzemeler ise hücreler ile birlikte ekilebilmek amacı ile tasarlanmışlardır.

2.1. Kemik, Temel Yapısı ve Kompozisyonu

Kemik, katı halde olup temel fizyolojik fonksiyonlara sahip özelleşmiş bir dokudur. Sahip olduğu sertlik, mutedil elastiklik ve çok kısıtlı plastiklik ve kırılganlık özelliği sayesinde ideal bir doku halini alır ve ayakta durmak, hareket etmek gibi fonksiyonları sağlamamıza yardımcı olur [87]. Bununla birlikte, sahip olduğu mikroyapının düzenlemesi ve iç kısımlarındaki çukurların mevcudiyeti kemiğe en uygun ağırlık-dayanım oranı sağlamaktadır. Bu yaygın olarak bilinen özellikler bütün iskelet yapı içinde aynı görünmektedir çünkü ilk bakışta kemiğin yapısı ve kompozisyonu her açıdan aynı gibidir. Fakat yakından incelenecek olunursa, kemik çok heterojenik bir doku olacaktır; kompozisyonu ve yapısı iskelet bölgesine, fizyolojik fonksiyona, yaş ve cinsiyete göre değişkenlik göstermektedir. Yetişkin bireyde 206 adet kemik bulunur, bu oran insan vücudunun toplam ağırlığının % 14'lük kısmına denk gelir. En uzun kemik yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 2.5 cm genişliğinde olan uyluk kemiğidir, en kısa kemik ise orta kulakta yer alan üç kısa kemikten biri olan üzengi kemiği olup uzunluğu 0.18 cm'dir.

Kemiğin fonksiyonlarını sıralayacak olursak; ilk olarak koruyucu bir özellik sergilemektedir. İç organları olası darbelere karşı korumaktadır. Vücuda şekil verir. Kemik iliği vasıtasıyla vücuda kan üretir. Kalsiyum ve fosfor gibi vücutta kullanılan minerallerin depolanmasını sağlar. Ayrıca yağ depolanmasını sağlar. Kemik kandaki pH değerini, alkalin tuzlarını ortama salarak ya da absorplayarak ayarlar ve asit-baz dengesini korur. Bir diğer özelliği ise, detoksifikasyon olup ağır metallerin dokulara zarar vermesini engellemek amacıyla kemik dokuda saklanabilmesidir. Kulakta yer alan kemiklerimiz sayesinde işitme özelliğine sahip oluruz. Kemiğin en önemli fonksiyonlarından biri de harekettir. Kemikler, iskelet kasları, tendonlar, ligamentler ve eklemler birlikte hareket ederek güçleri birleştirip transfer ederek vücudun bir kısmını ya da tamamını üç boyutlu olarak yönlendirebilirler [88].

Mikroskopik seviyede kemiğin iki tipi mevcuttur;

-İmmatür kemik

-Lamellar kemik

İmmatür kemik normalde embriyoda, yeni doğan bebekte, kırık kallusunda, büyüyen kemiğin metafizlerinde, tendon ve ligamanların kemiğe bağlandığı bölgelerde, kranial kemiklerin sütürlerinde bulunur. Birim hacimde içerdiği hücre sayısı lamellar kemiğe göre 4 kat daha fazladır. Üretimi ve metabolizması çok daha hızlıdır. İmmatür kemiğin mineralizasyonu düzensizdir ve radyolojik olarak da düzensiz görülür. Lameller kemik doğumdan bir hafta sonra görülmeye başlar. Dört yaşında immatür kemiğin yerini hemen hemen bütünü ile lameller kemik almıştır. Lameller kemik birçok yapısal ve fonksiyonel sistemler içerir;

- Trabeküler lameller

- İnterstisyel

- Osteonlar.

Osteon lameller kemiğin bir formudur. Kemiğin boyuna uzunlamasına dizilmiş silindir şeklindedir ve ortasında Havers kanalı bulunur. Havers kanalı kan damarları, lenf damarları ve sinir yapıları içerir, çevresinde osteositler sirküler şekilde yerleşmiştir. Osteositlerin yerleştiği bölgelere lakuna denir. Lakunalar kanaliküller aracılığıyla Havers kanalı ve diğer lakunalar ile birleşir. Mineralize kemik matriksinden difüzyon sınırlıdır. Osteositler bu kanaliküller aracılığıyla metabolik olaylarını yaparlar. Lameller kemik yapısal organizasyonuna göre iki çeşittir:

-Spongioz,

- Kortikal.

Spongioz kemikler uzun kemiklerin metafiz, epifiz ve küboid kemiklerinde bulunur. Kortikal kemik küboid kemikleri sarar ve uzun kemiklerin diafizlerini oluşturur. Kortikal kemiğin 3 çeşidi vardır:

- Kompakt,

-Pleksiform,

- Haversian.

Küçük hayvanlarda kortikal kemiğin özel damar iletişimi yoktur. Kortikal kemik basit lameller kemik tabakalarından oluşur, bu tip kemiğe kompakt kemik denir. Daha büyük hayvanlarda hızlı büyüme ile kortikal kemik, lameller kemik ve immatür kemik tabakalarından oluşur. Vasküler kanallar immatür kemik tabakalarına yerleşmiştir. Bu tip kemiğe pleksiform kemik denir. Periost sinoviyal eklemler, tendonların kemiğe bağlandığı bölgeler, ligamanlar, interosseöz membranlar bölgesi hariç kemiğin dış yüzeyini örten zardır. Dış tabaka (Fibröz tabaka) ve iç tabaka (Kambiyum ya da osteojenik tabaka) olmak üzere iki tabakası mevcuttur. İç tabaka daha damarsal ve hücreden zengindir. İçerdiği hücreler osteoblastlara dönüşebilir, ayrıca bu hücreler uygun koşullarda hyalin kıkırdak üretebilirler. Kırık iyileşmesinde kemik dışı bölgelerde

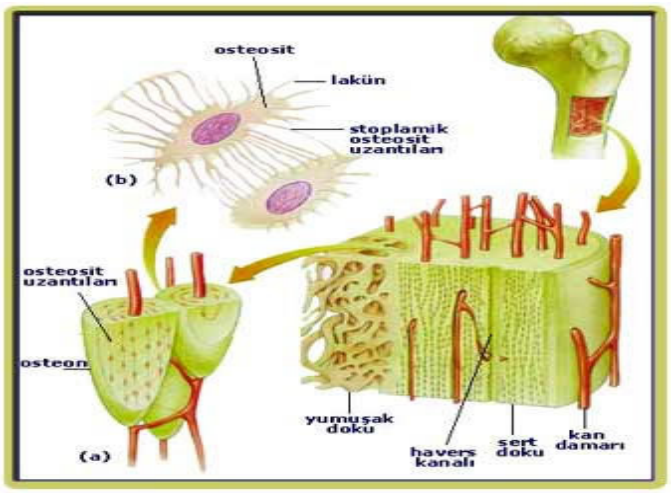
kallus oluşturabilirler. Periost hücrelerinin diğer bir özelliği de yaşam boyu kemik yapabilme yeteneğine sahip olmalarıdır [89].

2.2. Kemik Matrisin Temel Bileşenleri

Kemik makro düzeyde kortikal (veya kompakt) ve kanseloz (veya trabeküler) olmak üzere iki bölüme ayrılır. Bu iki yapı yoğunluk ve porozite bakımından birbirinden ayrılırlar [56]. Kortikal kemik sıkı tertiplenmiş, boşluk içermeyen bir dokudur, maksimum 1.8 g/cm^3 yoğunluğu sahiptir. Kanseloz kemik dokusu ise gevşek, labirent veya bol boşluklu bir görünüme sahiptir. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Yetişkin bir bireyin iskeletindeki kemiklerin % 80'i kortikal, % 20'si de kanseloz kemiklerden oluşmaktadır.

Kemikler yapısal olarak ikiye ayrıldığı gibi kemik matrisi de iki bileşene sahiptir; organik matris ve mineral maddeler. Kemiğin ağırlıkça % 65'ini inorganik bileşenler, % 25'ini organik bileşenler ve % 10′unu su oluşturmaktadır [90]. Kemiğin organik matrisi esas olarak % 90 gibi büyük bir yüzde ile tip I kolajen fibrilleri içerir. Geriye kalan % 10'luk kısım ise kolajen içermeyen proteinler, örneğin proteoglikan ve fosfolipidlerden oluşur[87]. Kolajen fibriller, üç polipeptit zincirin helikal konfigürasyonda düzenlenerek oluşturduğu filamentöz molekül topluluğudur. Bu zincirler değişik amino asit dizilimi içerirler ve bu nedenle de moleküller farklılık gösterirler. Kemiğin kolajen içermeyen bileşen kısmı, proteoglikan, fosfolipid, glikoprotein ve fosfoproteinler gibi proteinlerden oluşmaktadır. Ayrıca, büyüme faktörleri ve alkalin fosfataz, metaloproteinaz içeren kalsifiye matris de bulunmaktadır. Kemiğin tipine göre ve kemiğin yer aldığı bölgeye göre kolajen içermeyen proteinlerin (osteopontin, osteonektin, kemik sialoprotein) miktarı ve dağılımı değişiklik göstermektedir. Örgü kemik ise kemik asidik glikoprotein-75 içeren tek tip yapıdır. Proteoglikanlar kalsifikasyon prosesi esnasında inhibitör ya da promoter role sahiptirler. Fosfolipidler, kalsifiye matrisde bulunup kalsifikasyon esnasında çok önemli rol üstlenirler.

Kemiğin mineral matrisi ise iyon rezervuarı olarak görev yapmaktadır ve kemiğe sertlik özelliğini, sıkıştırmalara karşı olan direncini vermektedir. Mineral maddelerinin başında kalsiyum, fosfat, nitrat, magnezyum gibi maddeler gelir. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kemik kolajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte iç içe organize olmuşlardır.



Şekil 2.1. Kemik matrisin temel bileşenleri

2.3. Kemiğin Kan Akımı

Kemiğin üç adet ayrı fakat birbiri ile ilişkili dolaşım sistemi vardır:

-Nutrisyonel sistem

-Metafizyel kompleks

-Periosteal kapiller

Nutrisyonel sistem major arterini sistemik dolaşımdan alır. Arter kemiğe diafizden girer. Her uzun kemiğe giren arter sayısı farklıdır. Medüller kanalda nutrisyen arter inen ve çıkan arterlere ayrılır. Bu arterlerde arteriollere ayrılır. Bu arterioller de endosteal yüzeyi delerek kemiğin diafizini beslerler. Normal şartlarda periost ile örtülü kemiğin tamamını bu arter besler. Kan akımı medulladan kemiğin dış yüzeyine doğrudur. Bu özellik kemiğe fasyal bağlanma bölgelerinde farklıdır. Bu bölgelerde periosteal damarlar korteksin 1/3 dış kısmını beslerler. Bazı araştırmacılara göre korteksin dış % 15-20'sini fasyal bağlanma bölgesi olmasa da periosteal damarlar beslemektedir. Metafizyel kompleks, periartiküler pleksustan beslenir. Periartiküler pleksustan gelen arterler metafiz bölgesindeki ince korteksi delerek metafizi beslerler. Bu arterler diafizden gelen arterler ile anastomoz oluştururlar. Bu üç sistem birbiri ile ilişkilidir. Örneğin medüller arter yaralandığında periosteal sistem baskın hale geçerek diafizyel korteksin revaskülarizasyonunu sağlar [93, 94].

2.4. Kemik Hücrelerinin Morfolojisi

Kemik dokusunda dört hücre tipi görülmektedir. Bunlar osteoblast, osteoprogenitör, osteosit ve osteoklast hücreleridir.

Osteoblastlar, yeni kemik üreten farklılaşmış mezenkimal hücreleridir [91]. Osteoblastların farklılaşması üç aşamada gerçekleşmektedir; üreme, matris olgunlaşması ve mineralizasyonu. Kolajen tip I, osteopontin, osteokalsin ve alkalin fosfataz aktivitesi osteoblastik fenotipin göstergesidir [90]. Osteoblastlar kuvvetli alkalin fosfataz ile reaksiyon verdikleri için organizmada kemik yapım hızının ölçülmesi istendiğinde kandaki alkalin fosfataz enzim seviyesine bakmak yeterlidir.

Osteoprogenitör hücreler, kemiğin ana hücreleri olup mezenkimalden kaynaklanırlar. Osteoprogenitör hücreleri mitozla olgun kemik hücrelerine farklılaşırlar. Bu hücreler kemik büyümesinde, zedelenmesi veya kırık tamirinde aktif hale gelerek bölünürler ve osteoblast hücrelerine dönüşürler.

Osteoklastlar, kemikte yıkımı ya da kemik rezorbsiyonunu gerçekleştiren hücrelerdir. Osteoklastlar kemiği asit ile demineralize ederler ve içerdikleri kolajenaz enzimi ile kolajen yıkımı yaparlar [91].

Osteositler, osteoblast ve osteoklastlardan farklı olarak kemik matriste yer alan olgun kemik hücreleridir[88]. Osteoblastların farklılaşmasıyla oluşan bu hücreler lakünada bulunurlar ve çevresindeki komşu osteositlerle kanalikula yoluyla temasa geçerler [91]. Kemik matriste yer alan tek hücre tipi osteositler olduğu için olası bir kemik matris hasarında ilk etkilenen hücreler de yine osteositler olmaktadır. Böyle bir durum osteositlerin kemik matrise tutunmasını engelleyebilir, birbirleriyle kanalikulalardaki iletişimleri etkilenebilir. Osteositler olgun hücreler oldukları için sentez yapamazlar. Osteositlerin kalsiyumun kemiklerden kana verilmesinde ve hameostatik mekanizmayı düzenleme (kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyerek) gibi önemli metabolik rolleri vardır.

Osteoblast ve osteositler kemik yapan hücrelerdir. İki hücre arasındaki esas farkı bulundukları yerdir. Osteoblastlar kemik yüzeyinde bulunurlar. Osteositler ise kemik mineralize matriksi ile örtülüdür. Işık mikroskopunda aktif osteoblastlar bazofilik boyanırlar. Nukleusları kemikten uzak membrana yakın durur. Sitoplazmalarında nukleus, golgi cisimciği ve pürüzlü endoplazmik retikulum olmak üzere üç temel komponent bulunur. Osteoblast hücrelerinin dış membranında alkali fosfataz enzimi aktivitesi mevcuttur ve elektron mikroskopi çalışmalarında osteoblast hücre membranı ile mineralize kemik matriksi arasında, mineralize olmayan kemik matriksi oluştuğu saptanmıştır. Osteositler konsantrik olarak osteonun santral lümenive lameller

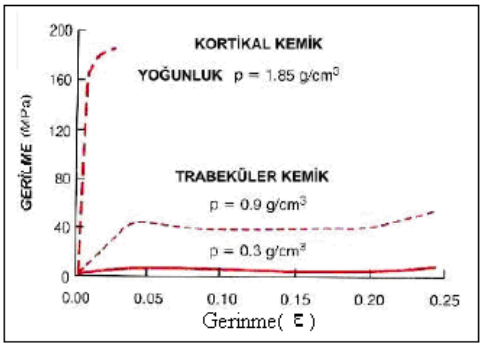
kemik arasında bulunur. Osteositler osteoblastların yüzey rezorpsiyonuna bağlı olmadan rezorpsiyon ve sekresyon görevlerini yürütebilir. Osteoklastlar kemiğin rezorpsiyon yapan hücreleridir. Büyüklükleri ve birden fazla nükleusları ile karakterizedir. Monositler ve makrofajlar gibi kemik iliğinin pluripotent hücrelerinden oluşurlar. Osteoklastların kemik rezorpsiyonu için yerleştikleri bölgelere "Howship lakuna" denmektedir [94].

Tablo 2.1. Işık mikroskopisi altında osteosit ve lakünaların sınıflandırılması

Tip	**Şekil**	**Kenar**	**Boyanması**
Normal osteositler	Yuvarlak veya oval	Düz	Periferi koyu, santrali soluk
Piknotik osteositler	Yuvarlak ve yoğun	Relatif düz	Koyu
Soluk osteositler	Düzensiz ve belirsiz	Düzensiz	Normal osteositle kıyaslandığında soluk
Boş osteosit ve laküna		Hücre kalıntıları ya da	Lakünada hiçbirşey yok

2.5. Kemiğin Mekanik Özellikleri

Kemik makro düzeyde kortikal (veya kompakt) ve kanselloz (veya trabeküler) olmak üzere iki bölüme ayrılır. Femur gibi bir uzun kemiğin kesiti, yoğun kortikal kabuk ve poroz kanselloz iç yapıya sahiptir. Bu iki yapı yoğunluk ve porozitelerinden ayrılabilir(Sekil 2.2.). Yogunluktaki küçük değişimler, mukavemet ve elastisite modülü degerlerinde büyük degişimlere neden olur. Yogunluktaki değişimler ayrıca yaşlanmaya, hastalıga ve kemiği kullanma ya da kullanmamaya bağlıdır. Kortikal kemiğin mikroyapısı düzenli silindir biçimli lamellerden oluşur.



Şekil 2.2. Kortikal ve trabeküler kemik için gerilme- zorlanma eğrisi.

Kemiğin mekanik özellikleri incelenirken daha çok kortikal kemik referans olarak alınmaktadır ve kanselloz kemik daha az dikkate alınmaktadır. Kanselloz kemiğe ait değerler kortikal kemiğe ait olanlara göre oldukça düşüktür. Örneğin kortikal kemiğin elastisite modülü 17 GPa iken, kanselloz kemiginki 75,5 MPa'dır [95]. Kortikal kemik yoğun bir maddedir ve maximum 1,8 g/cm^3 yoğunluga sahiptir, bagıl yoğunluğu ise 0,7-0,95 g/cm^3 arasında değişir. Kanselloz (trabeküler) kemik kısa çubuk şeklinde kemik maddesinden oluşur ve süngerimsi bir görünüşü vardır [96]. Kanselloz kemik ise daha çok kortikal kemiğin iç yüzeyinde ve uzun kemiklerin uç kısımlarında bulunur. Her iki kemikte temelde aynı maddeden meydana gelir. Bileşenlerin düzensiz fakat optimize olmuş aranjman ve oryantasyonu kemik malzemesini heterojen ve anizotropik yapar [97]. İskelet sistemi iç organları koruyan, saglam bir kinematik link oluşturan, kaslarla yapısal yerler sağlayan ve bu sayede vücut hareketlerini destekleyen bir yapıdır. Kemiğin biyomekanigi de bu kompleks görevleri yapabilmesi için özelleşmiştir. Kemik kendini tamir edebilen, internal yapısını ve konfigürasyonunu değişen mekanik ihtiyaçlarına göre ayarlayabilen bir dokudur. Uzun süre devam eden aşırı yüklenme ya da az yüklenme mutlaka kemik yoğunluğunu değiştirir. Demir ile karşılaştırıldığında kemik 3 kat hafif, 10 kat daha esnektir. Kollajen içerik burulma, mineral içerik ise basmaya karşı dirençten sorumlu olup mukavemetli ve rijittir. Bu özellikleri anlamak için kemiğin yüklenme altında gösterdigi degişiklikleri incelemek gerekir.

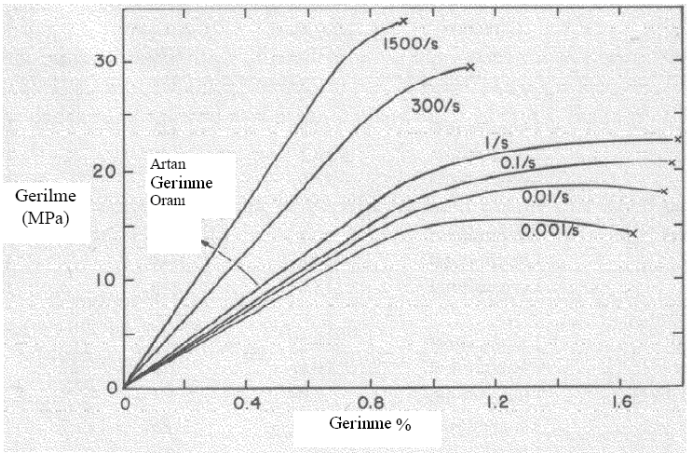
Tablo 2.2. Bazı Kemiklerle İlgili Mekanik Özellikler [97]

Doku	Test Doğrultusu	Young Modülü(GPa)	Kopma Dayanımı (MPa)	Basma Dayanımı (MPa)
Bacak Kemikleri				
• Femur	Uzunlamasına	17,2	121	167
• Tibia	Uzunlamasına	18,1	140	159
• Fibula	Uzunlamasına	18,6	146	123
Kol Kemikleri				
• Humerus	Uzunlamasına	17,2	130	132
• Radius	Uzunlamasına	18,6	149	114
• Ulna	Uzunlamasına	18	148	117

Kuru kemik ıslak olana göre daha yüksek elastiklik modülüne ancak daha düşük tokluk, kırılma dayanımına ve şekil değiştirme kapasitesine sahiptir. Islak kemik, kırılma öncesi daha fazla

enerjiyi emebilme ve uzama özelliklerine sahiptir [105-107]. Osteonlar, gelen yük doğrultusu eksen yönünde olduğu için, kemik boyunca uzunlamasına dizilme eğilimindedirler. Bu nedenle de uzunlamasına doğrultuda kemiğin elastiklik modülü radyal doğrultuya oranla 1,5-2 kat daha fazladır. Genel olarak, mineral oranının artması kemiğin daha yüksek bir elastiklik modülüne ve eğilme dayanımına sahip olmasına ancak, daha düşük tokluk göstermesine neden olur [97-99].

Şekil 2.3. de de görülebileceği gibi, yükleme hızı arttıkça elastiklik modülünün, akma ve basma dayanımları artmaktadır. Ancak, kopma uzaması ve kırılma tokluğu değerleri maksimum bir değere ulaştıktan sonra azalmaktadırlar [97-99].

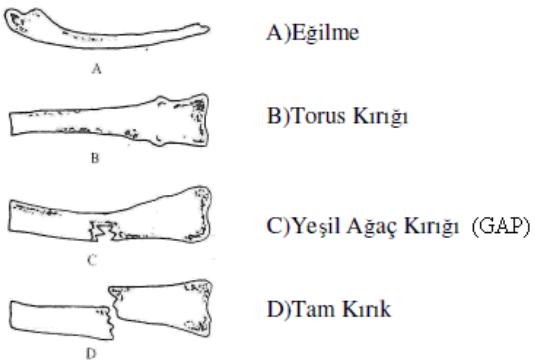


Şekil 2.3. Kopma Dayanımının Şekil Değiştirme Hızıyla Değişimi Grafiği

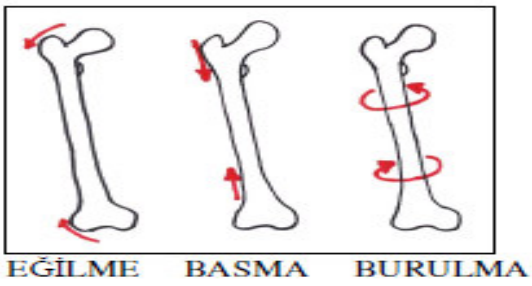
Kemik viskoelastik bir malzeme olduğu için yüksek yükleme hızlarında daha rijit ve daha yüksek dayanımlara sahiptir. Ayrıca fizyolojik sınırlardaki yüklemelerde yükleme hızı arttıkça kemik, kırılma öncesinde daha fazla enerji yutabilme özelliğindedir. Şekil 2.3.'de görülebileceği gibi yüksek yükleme hızlarında kemiğin dayanımı %100'e yakın artmaktadır [97-99].

Elastik bölgede, yükleme kalıcı deformasyona neden olmaz. Fakat akma noktası geçilirse plastik deformasyon başlar. İzotrop malzemelerde mekanik özellikler malzemelerin her bölgesinde aynı iken kemik gibi anizotropik malzemelerde farklı bölgeler farklı mekanik özellikler içermektedir. Kemiğin uzun aksına dik gelen yüklere karşı gösterdigi elastisite modülü, paralel gelen yüklere karşı gösterdigi elastisite modülünün 2/3'ü kadardır. Bu iki yön dışında kemiğe gelen yükler bu sınırlar içinde kalacak şekilde dirençle karşılaşırlar. Bağıl yoğunluğu 0,05-0,37 g/cm^3 arasındadır. Trabekülerde kan damarları yoktur, boşlukları ise ilikle doludur. Kortikal kemiğin elastisite modülü gözenekliligine, kanselloz kemiginki ise minerilizasyon derecesine bağlıdır [100]. Kortikal kemiğin kırılması için orjinal uzunlugunu %2'sinin aşılması yeterli iken, kanselloz kemikte bu oran %7'dir. Genel olarak erişkin kortikal kemiği basmaya karsı çekmeden daha fazla

dirençlidir ve çekme zorlanmasına makaslamadan daha fazla dirençlidir. Ama çocukluk döneminde kemiğin basmaya karşı daha zayıf olması torus tipi kırıkların görülmesine neden olur. (Sekil 2.4.)

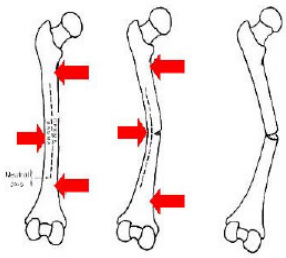


Şekil 2.4. Çocuklarda görülen kırık tipleri.



Şekil 2.5. Kemiğin yüklenme durumları.

Kortikal kemiğin eğilme ve burulma durumları Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



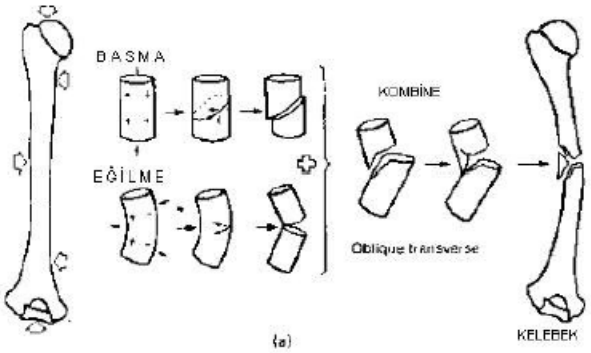
Şekil 2.6. Kemiğin eğilme yüklenmesi.

Kemiğin tamamı belli bir yükleme altında yüklemenin etki ettiği noktaya göre mekanik özellik gösterir. Hem basma hem de eksenel yükleme yarattığı için 3 nokta eğme yüklemesini incelemek kemiğin tamamının özelliğini anlamak için iyi bir modeldir. (Şekil 2.6) Etki noktasındaki kemiğin kesit geometrisi ve kemik dokusunun genel özellikleri bu noktada rol oynar. Kemik dokusunun daha önce anlatılan çekme ve basma dayanımları kemiğin direncini belirleyecektir fakat kemiğin kesitsel geometrisi de etkili olacaktır. Burada 2 faktör önemlidir:

-Ne kadar kortikal kemik yüzeyi içerdiği ve

-Bu yüzeyin kemik merkezinden ne kadar uzakta olduğu.

Eşit yüzey bölümüne sahip kesitler arasında merkezden daha uzağa yerleşimi olan bölgeler eğilme yüklenmesine daha fazla karşı koyabilir. Köprücük kemiği ve herhangi bir trabeküler kemik eşit kortikal kemik yüzey ölçümüne sahip olsalar da köprücük kemiği homojen olmayan şekli sebebiyle merkeze yakın olan noktalar içermektedir. Bu asimetrisi köprücük kemiğinin eğilme yüklenmesine göstereceği direnci azaltacaktır. Kemiğe burulma uygulandığında da kayma gerilmesi oluşur. Maksimum burulma dayanımı sonrası, kemikte boyuna çatlaklar oluşur. Bu çatlakların bitiş noktalarında yaklaşık 50 derece açılı olmak üzere iki spiral çatlak daha oluşarak kemiğin bütünlüğü bozulmaya başlar. Burulma yüklemeleri eğilme yüklemelerinden farklıdır. Burulma momenti etki eden noktaya olan uzaklık ile değişiklik göstermez. Örneğin bir kayakçının kayaklarını dışa çevirecek şekilde bir yükleme gelse ayak bileği ve diz ekleminde internal burulma torku oluşur. Bu tork tibianın distalinde ve proksimalinde aynı düzeydedir. Eğilme ile oluşan kırıklar etki noktasında oluşurken, burulma ile oluşan kırıklar kemiğin kayma mukavemetinin en az olduğu yerde oluşur. Bu olay birkaç kesitte aynı zamanda olabilir. Kemiğin farklı yerlerinde boyuna çatlaklar oluşur. Bu çatlakların bitiş noktalarından zıt yönlere doğru ikincil çekme gerilmesi çatlakları uzanır. Kemiği dolanarak sağlam korteksin bütünlüğünü bozar ve kırık oluştururlar. Bu başlangıç çatlaklarının boyu 2-3 mm dahi olabilir. Eşlik eden kelebek fragmanının olup olmaması yüklenmenin hızı ile ilgilidir. Her yüklenme basit bir çatlakla başlar ama yavaş olanlar çatallaşma göstermeden ilerler. Hızlı olan yüklenmeler sayısı artan çatallaşmalar yapar (Kelebek fragman oluşması (Şekil 2.7)).



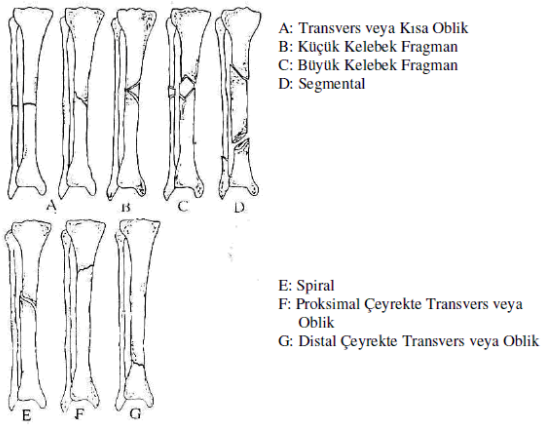
Şekil 2.7. Kemiğin kombine yüklenmesi.

Kemik biyolojik bir yapı olduğu için mekanik özellikleri yaş ile de değişmektedir. Erişkin kortikal kemiğin akma dayanımı ve elastisite modülü her on senede %2 oranında azalır. Üstelik bu değişiklikler kemikler arasında da farklılık gösterir. Örneğin femurdaki değişiklikler tibiadakine göre daha belirgindir. Erişkin dönemde kemiğin dış çapı büyümeye devam eder fakat modüler

kanal genişlemesi daha hızlıdır. Sonuç olarak kemikler daha geniş çaplı ama daha ince Böylece bükmeye maruz kalırsa belki aynı şiddetli bir yüklenme ile fakat çok daha az bir eğilme göstererek kırılır. Kemikteki her boşluk kemik direncini mutlaka azaltır fakat klinikte problem yaratacak olan sınır kemik çapının %30'udur. Kemikte oluşturulan gözenekler bükmelerde enerji absorbsiyonunun %50'sinin, burulmalarda %90'ının kaybına neden olur. Sadece bası etkisinde kalan defekt ve delikler çok fazla bir risk oluşturmaz [95].

2.6. Kemik Kırıkları

Dıştan veya içten gelen zorlanmalarla kemik dokusunda olan ayrılmaya, yani kemiğin bütünlüğünün ve devamlılığının bozulmasına, başka bir deyimle kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasına kırık diyoruz. Kemik bütünlüğündeki bozulma basit bir çatlaktan, bir veya birçok kemiğin çok parçalı kırığına kadar değişik şekillerde olabilir. Yaralanmaların %20'si alt, %47'si üst eksremitede olmak üzere kırıkların %78'i kol ve bacaktadır ve bunların %4 kadarı da öldürücü ve tehlikeli gruptadır. Yeni doğanlarda en çok klavikula, femur cismi, humerus kırılır. Çocuklarda humerus suprakondiler kırıkları başta olmak üzere dirsek çevresi ve ön kol kemikleri ile femur cismi en çok kırılır. Orta yaşta tibia, femur ve radius distali en çok kırılan bölgelerdendir. İleri yaşlarda femur boynu, humerus proksimali ve radius distali en çok kırık görülen bölgelerdendir. Bütün yaşlar ve diğer koşullar göz önünde bulundurularak yapılan kırılma oranı tahmininde en yüksek oran %15 ile tibia ve fibuladadır. Şekil 2.8.'de tibia kırıkları görülmektedir [101-103].



Şekil 2.8. Tibia kırıklarında Chapman sınıflandırması [103].

2.6.1. Kırık Tipleri

Kırığın nasıl oluştuğu, hangi zorlanmanın bunu yaptığı, kırılan kemiğin yapısı, kırığın şekli ve karakteri tedaviyi ve özellikle hastanın geleceğini etkileyeceği için bilinmesinde büyük yarar vardır.

Şematik olarak kırık tipleri söyle özetlenir.

- Kırık yapan zorlanmaya göre:

- Direk zorlanma ile olan kırıkları

- İndirek zorlanma ile olan kırıkları

-Kemik doku sağlamlığına göre:

- Normal kemikte kırık

- Patolojik kırık

- Stres kırığı

-Kırık çizgisine göre:

- Enine (transvers) kırık

- Oblik (eğik) kırık

- Kopma (avulsion) kırığı

- Parçalı (comminuted) kırık

-Kırık sayısına göre:

- Tek (basit) kırık

- Birden fazla kırık

-Kırık derecesine göre:

- Tam (ayrılmış) kırık

- Tam olmayan kırık

- Çatlak (fissur, linear kırık)

- Yeşil yas ağaç kırığı

- Çökme (renforcement, depresse) kırığı

- Basma (kompression) kırığı

- Dişlenmiş (testere) kırık

- Epifiz ayrılması

- Kemiğin anatomik bölgesine ayrılması

- Distal bölge kırıkları

- Orta bölge (cisim) kırıkları

- Proksimal bölge kırıkları

- Epifiz bölge kırıkları

- Özel anatomik bölge kırıkları (kondiler, suprakondiler , malleoler, subtrokanterik vb.)

- Çıkık kırıklar (Fracture-Dislocation)

- Kemiğin histolojik yapısına göre

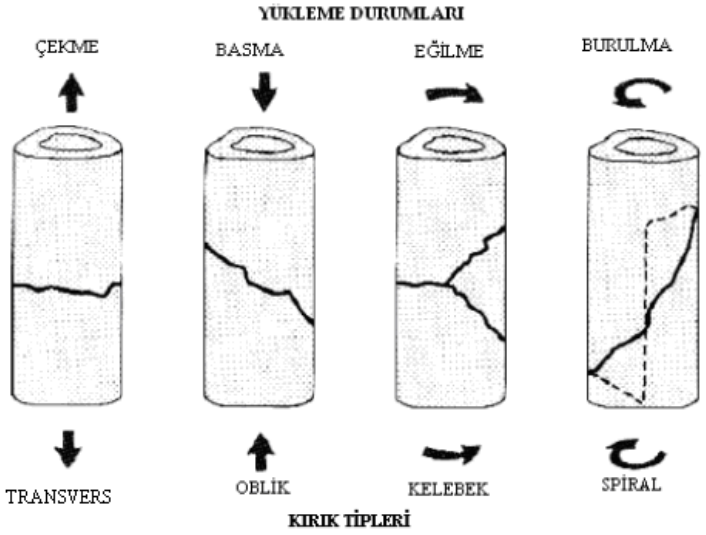
- Spongioz (kanselloz) kemik kırıkları

- Kortikal kemik kırıkları [101,102,104]

Kemikte meydana gelen kırık direk kemiğe veya kemiğin bulunduğu bölgeye gelen zorlanma ile olabildiği gibi; indirek zorlanma etkisiyle de olabilir. Malzeme olarak kemik metallerden farklı özelliklere sahiptir. Kemiğin yüksek basma dayanımı, organik kollajen ve apatit kristallerden oluşan kompozit bir yapıya sahip olmasından kaynaklanır [102].

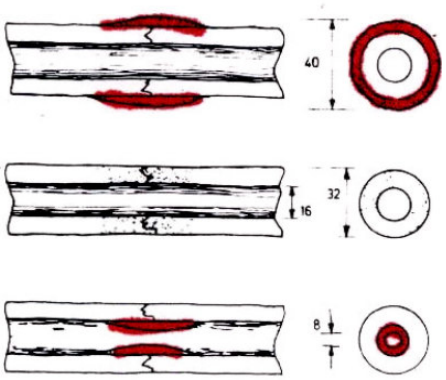
2.6.2. Kırık Mekanizması

Kemik plastik deformasyon olmadan önceki çekme gerilmesi, maksimum gerilmenin %0,75'i ve kırılma gerilmesinin %2-4'üdür. Elastik bölgedeki yüklemenin 6 katını plastik bölgede karşılayabilir. Hidroksiapatit kristalleri oldukça yakın ilişkide, fakat birbirinden ayrı bölümler şeklinde dizilir. Bu nedenle oluşan mini kırıklar kristal parçaları arasında lineer olarak ilerleyemez ve kristal üniteleri arasındaki boşluklara gelince kırık ilerleme yönü değişir. Mikro kırıkların şekli T halini alır ve bu sapmalar kırık enerjisini azaltır. Kırık gelişmeden önce kemiğe uygulanan yüklenme ne kadar hızlı ise kemik o kadar fazla enerji absorbe eder. Bu enerji miktarı hem kırık tipini hem de etraftaki yumuşak doku hasarını belirlediği için önemlidir. Çünkü kırılma anında kemik o ana kadar absorbe ettiği enerjiyi serbest bırakır. Hızı yüksek olan yüklenmelerde kırık parçalı olup yumuşak doku hasarı fazla olmaktadır. Yükleme hızına göre kırklar düşük enerjili (ev kazaları), yüksek enerjili (trafik kazaları) ve çok yüksek enerjili (ateşli silahlar) olmak üzere üçe ayrılabilir. Etki eden gerilmeye göre ise çekme (kopma kırıkları), basma (Vertebra kırıkları), burulma (Femur kondil kırıkları) ve eğilme kırıkları (Tibia ve femur) olarak 4'e ayrılabilir (Şekil 2.9).

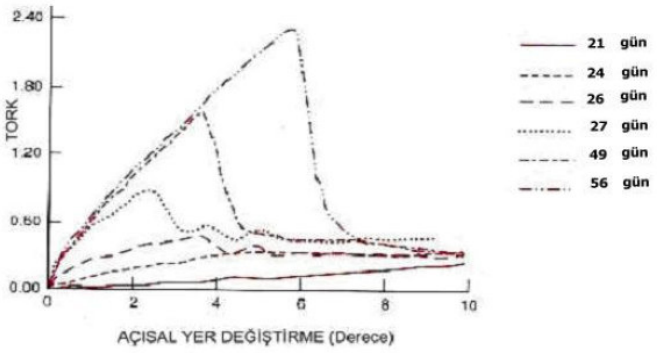


Şekil 2.9. Yükleme durumlarına göre kırık tipleri.

Kemiğin kırık sonrası remodelizasyonu implantın konup konmamasına göre değişiklik gösterir. Kırık sonrası fragmanlar arasında sadece aksiyal planda gelen kompresif yükler iletilir. Anatomik bütünlük bozulduğu için çekme, kesme ve eğilme yüklemelerini fragmanlar birbirine aktaramaz. Bunun için kullanılacak implantın belli yükleri karşılaması gerekir. İntramedüller implantlar kırık fragmanlarının kompresif yükleri iletmesini engellemezler fakat plak-vida sistemleri her türlü yüklemeyi üstüne alan implantlardır. Kırık kaynadıkça kemik ve plak arasında yük taşıma paylaşılır. Bu paylaşım, kullanılan implantın elastisite modülüne ve geometrisine bağlı olarak değişir. Plaktan kemiğe yük aktarma olayı özellikle kemik ve vida arasında gerçekleşir ve vida etrafında kemik hücrelerinin genişlemesi gözlenir. Büyük plaklar kemiğin yükünü tamamen üzerine alarak kemiği stressiz bırakır ve atrofiye neden olurlar. Kırık kaynadıktan sonra yerinde bırakılan bir plak kemik çapında azalmaya kadar giden bir repozisyona neden olabilir. Bu azalma eğilme ve burulma mukavemetini azaltacaktır. Çaptaki %20'lik bir azalma burulma mukavemetini %60 azaltır. Fizyolojik yüklenmelere maruz kalan kemik eski biyomekanik özelliklerini zamanla kazanır [95]. Kırılan kemik iyileşirken yeni bir kemik dokusu oluşur (callus). Callus zamanla artar. Callus yarıçapındaki artış kırık kemiğin atalet momentini ve rijitligini büyük oranda artırır (Şekil 2.9). Kemik normal rijitligine 27 günde ulaşır. Aşağıdaki grafikte (Şekil 2.11) iyileşen kemiğin tekrar kırılması için gerekli olan tork iyileşme sonrası farklı dönemler için gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Kırık kemikte callus oluşumu. İlk durumda 0.5 kat zayıfken kemik çapı 40 mm'ye ulaştığında 1.6 kat güçlüdür.



Şekil 2.11. İyileşme sonrası dönemlerde tekrar kırılma oluşturabilecek tork miktarı.

2.6.2.1. Yorulma Kırıkları

Aynı metaller gibi kemik de tekrarlayan stresler sonucunda bütünlüğünü kaybedebilir. Buradaki temel faktörünü kemik etrafındaki kaslarda yorgunluk olması ve gücü absorbe eden bu kasların yorulması sonucunda bütün yükün kemik üzerine gelmesi olduğu düşünülmektedir. Tekrar eden yüklenmeler akma mukavemeti ve rijitlikte düşmeye neden olur. Yorulma kırığının şekli çekme tarafında transvers kırık, kompresyon tarafında oblik kırıktır. Bu olayda belirleyici parametreler yüklemenin miktarı, frekansı ve kemiğin yoğunluğudur [95].

2.7. Kemik Kırıklarının İyileşmesi

Kemik dokusunda içten ya da dıştan gelen zorlamalar nedeniyle oluşan ayrılmaya, başka bir deyimle kemiğin anatomisindeki bütünlüğün bozulmasına *kırık* denir [89]. Kemik kırıklarının onarım süreci birçok bakımdan embriyonik kemik oluşumuna benzer ve üç aşamadan oluşur; enflamasyon, onarım ve yeniden modellenme [88]. Kırıklar genellikle ilk olarak kanın pıhtılaşmasına neden olur. Pıhtı telleri fagositik hücrelere kimyasal uyarıcılar yollar ki bu vesileyle

hasar görmüş bölgedeki hücresel kalıntılar ortamdan uzaklaştırılır. Enflamasyon aşaması en kısa aşamadır ve yaklaşık olarak 72 saat sürer [84]. Enflamasyon aşamasının ardından onarım süreci başlar ki zaman bakımından iki günden iki haftaya kadar sürebilir. Onarılmış dokunun gelişimi kırık pıhtısının düzenlenmesini içerir. Kemik sınırlarında fibroblast ve kondroblastlar görülür ve kıkırdak (kolajen tip II) oluşumu gözlemlenir. Ardından pıhtı geçici kemik olan *callus* ile yer değiştirir. Kemik sınırları arasında köprü oluşturmaya yetecek kadar *callus* oluşunca onarım aşaması biter ve yeniden şekillenme aşaması başlar. Bu aşama uzun sürer ve yedi yıla kadar çıkabilir. Bu aşamada *callus* endokondral kemik oluşum yoluyla örgü kemik ile yer değiştirir. Örgü kemik ağır ağır rezorbe olur ve lameler kemik ile yer değiştirir.

2.8. Vaskülarize Serbest Kemik Greftleri

Vaskülarize kemik transferi ilk kez 1867'de Ollier tarafından ortaya atılmış ve 1889'da Wagner tarafından başarılmıştır. Deneysel olarak vaskülarize kemik greftleri ilk olarak Ostrup ve Frederickson tarafından 1974'de yapılmıştır. 1975'te Taylor ve arkadaşları ilk insan serbest vaskülarize fibula greftini, tibianın segmental defekti için kullanmışlardır. Ondan sonra çeşitli serbest kemik grefti modifikasyonları geliştirilmiştir. Vaskülarize serbest fibula grefti, temel segmental uzun kemik ya da mandibula defektlerinde rekonstrüksiyon için tercih edilen donör saha seçeneğidir. Yeterli kemik uzunluğu sağlar, sert ve kalın kortekse sahiptir, osteotomiden sonra kolay şekillendirilmesi sağlanır. Serbest vaskülarize kemik grefti endikasyonları arasında travmaya veya tümöre sekonder uzun segmental kemik defektleri, konjenital tibia veya önkol psodoartrozları, dirençli nonunion, osteomyelit ve mandibula rekonstrüksiyonu yer almaktadır [107]. Vaskülarize kemik greftinde hücresel canlılık korunur. Kemik greftleri basit kırık iyileşmesine benzer şekilde iyileşir. Osteokondüksiyon gerekli değildir. Nonvaskülarize greftlerden daha az rezorpsiyona uğrarlar. Kemik grefti santral bölgesinde bulunan rezorpsiyon nedeni ile vaskülarize kemikten mekanik olarak daha zayıftır. Mikrovasküler cerrahinin gelişimi ile sınırlı sayıda olan donör kemik sayısı da artış göstermiştir. İleum, skapula, metatars, radius, kot, fibula, kalvarial kemikler vaskülarize transfer amacıyla kullanılmıştır. Kemik beslenmesinin iyi bilinmesi vaskülarize kemik transferlerinin dizayn ve kullanımı için zorunludur. Uzun kemiklerin beslenmesi üç ana kaynaktan sağlanır:

- Nutrisyonel arter; Uzun kemiklerin başlıca vasküler desteğidir.

- Diafizyal periosteal damarlar diafizin dış korteksinin 1/3, 1/2' sini besler.

- Metafizyal- epifizyal periosteal damarlar; bu damarlar kartilajinöz gelişim plağı ile ilişkili olup gelişimin tamamlanmasından sonra da kalarak besleyici arter ile bir anastomik ağ oluştururlar.

Yassı ve membranöz kemiklerin kanlanması farklıdır. Bir besleyici arterleri olmasına karşılık plastik cerrah tarafından kullanımı güçtür, periosteal pediküllerin kullanımı daha uygundur.

2.9. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyolojik sistemlerle temas halinde olup, bulunduğu ortamın doğal etkinliğini tedavi etmek, iyileştirmek ya da vücuttaki herhangi bir fonksiyonun, dokunun veya organın yerini almak için kullanılan doğal ya da sentetik malzemelere biyomalzeme denir.

Literatürde en yaygın olarak kullanılan biyomalzeme tanımı; Biyolojik sistemlerle etkileşim için hazırlanmış, tıbbî araçlarda kullanılan cansız malzemelerdir [92].

Bu açıklamadaki tıbbî terim kaldırılırsa, tanımlama kapsamı genişler ve malzeme çok yaygın bir kullanım alanına sahip olur. Cansız terimi kaldırılırsa bu sefer de tanım çok genel bir anlama sahip olup, yaşayan hücrelerin kullanılmakta olduğu birçok melez yapay organ ve doku mühendisliği uygulamalarını kapsar hale gelir.

Bir malzemenin biyomalzeme olduğunu nitelendirecek en önemli önkoşul biyouyumluluktur yani spesifik uygulama esnasında malzemenin konuk olduğu ortama karşı sergilediği en uygun tepkidir [108]. Tepki olarak beklenilen en uygun davranışlar ise kan pıhtılaşmasına karşı gösterilen direnç, bakteriyel kolonizasyona karşı gösterilen direnç ve normal, komplike olmayan tedavi etme özellikleri olarak sıralanabilir.

Tablo 2.3'de biyomalzemelerin konuk olduğu ortamı etkileyebilecek karakteristik özellikleri verilmektedir.

Tablo 2.3. Ev sahibi ortamı etkileyebilecek malzemenin sahip olduğu karakteristik değişkenler.

Malzemenin kütle özellikleri, mikro-(nano-) yapısı, morfolojisi
Kristalite ve kristalografisi
Elastiklik
Su yüzdesi, hidrofilik-hidrofobik denge
Makro-, mikro-, nano- porozite
Yüzey kimyasal kompozisyonu
Yüzey topografisi
Yüzey enerjisi
Bozunma profili, bozunma yan ürünleri ve toksikliği (Polimerik malzemeler için)
Katkı malzemeleri, katalizörler, kontaminantlar ve onlara ait toksik maddeler (Polimerik malzemeler için)

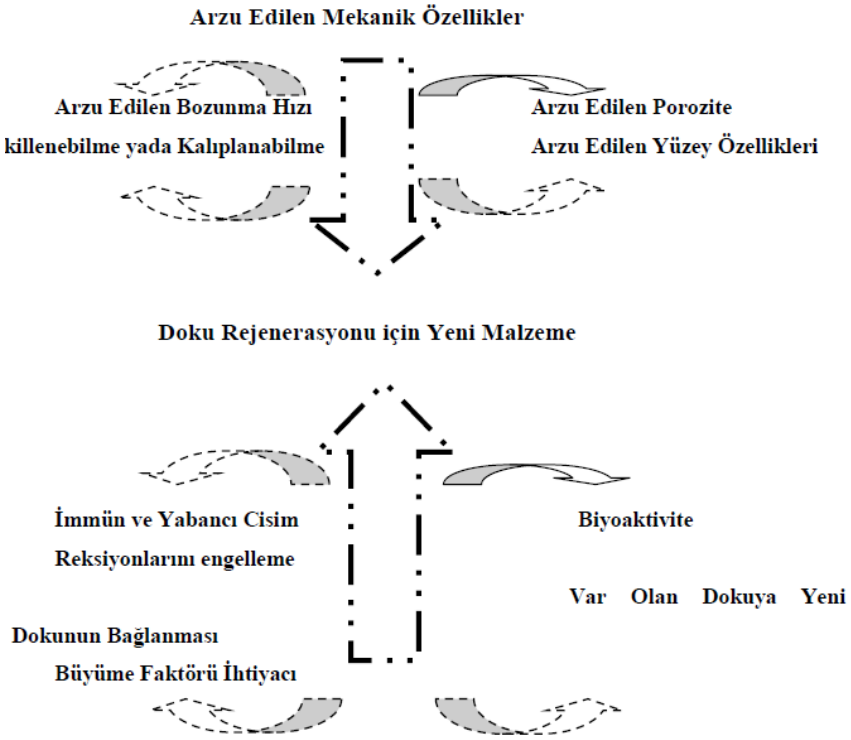
Tablo 2.4. de ev sahibi ortamın biyomalzemeye karşı gösterebileceği tepkiler verilmiştir.

Tablo 2.4. Ev sahibi ortamın biyomalzemeye karşı gösterebileceği tepkiler

Protein adsorpsiyon ve desorpsiyon karakteristiği
Genelleştirilmiş sitotoksik etkiler
Nütrofil aktivasyonu
Fibroblast davranışı ve fibrosis
Doku/organ spesifik hücre tepkileri
Antibadi üretimi, immün hücre tepkileri
Tümor oluşumu

Bir biyomalzenin biyouyumluluğu kadar toksik özellik göstermemesi de beklenilmektedir. Örneğin Polimerik biyomalzemeler sentezlenirken katkı maddeleri kullanılmaktadır ve bu maddelerin Polimerik ağ yapıdan dışarıya salgılanıp bulunduğu ortamdaki hücrelere toksik bir etkide bulunmaması gerekmektedir [109].

Yeni bir biyomalzeme sentezlerken göz önüne alınması gereken ilk şey malzemenin biyolojik, tıbbî ve mühendislik özelliklerini uygun bir şekilde birbirleri ile bütünleştirilebilmektir. Biyomalzemenin hazırlanma işlemi biyolojik ve yapısal özellikler açısından kompleks bir durumdur. Malzeme Bilimi ve Mühendislik dallarına düşen görev, hazırlanan malzemenin arzu edilen mekanik özelliklerini örneğin; bozunma hızı, şekillendirilme özelliği, yüzey morfolojisi ve porozitesi vb. gibi kullanılacak dokunun özelliklerine göre uyarlayabilmektir [110]. Biyolojik ve tıbbî olarak da biyomalzemenin arzu ediliyorsa büyüme faktörü, dokuya tutunmayı kolaylaştıracak hücre tipi taşıması ya da tutunmayı kolaylaştıracak uygun bağlayıcı ajanlar içermesi, bağışıklık sistemi tarafından yabancı madde olarak algılanmaması ve arzu edilen biyoaktifliği gösterip göstermediği incelenip onaylanmalıdır.



Şekil 2.12. Yeni biyomalzeme dizayn ederken göz önüne alınan faktörler[55].

Biyomalzemeleri ilk olarak metaller, seramikler, kompozitler ve polimerik malzemeler olarak sınıflandırabiliriz [111]. Seramik biyomalzemeler örnek olarak; alüminyum oksit, biyoaktif cam, karbon ve hidroksiapatit (HA) sıralanabilir. Altın, tantal, paslanmaz çelik ve titanyum alaşımları yaygın olarak kullanılan metal ve alaşım biyomalzemelerdir.

Yaygın olarak kullanılan Polimerik biyomalzemelere örnek olarak polietilen (PE), poliüretan (PU), politetrafloroetilen (PTFE), poliasetal (PA), polimetilmetakrilat (PMMA), polietilenteraftalat (PET), silikon kauçuk (SR), polisülfon (PS), polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asit (PGA) verilebilir. Her malzemenin kendine özgü uygulama alanı mevcuttur. Ortopedik alanda mekanik dayanımı kuvvetli yapılara ihtiyaç duyulduğundan metal ya da metal alaşım biyomalzemeleri daha yaygın kullanılmaktadır. Ancak, metal biyomalzemelerin bazı dezavantajları vardır. Biyouyumlulukları düşüktür ve korozyona uğrayabilirler. Ayrıca dokulara göre çok serttirler ve alerjik doku reaksiyonlarına neden olabilecek metal iyonu salımı söz konusu olmaktadır. Metallere göre seramikler, biyouyumlulukları son derece yüksek olan ve korozyona karşı dayanıklı malzemelerdir. Olumsuz özellikleri ise kırılgan, işlenmesi zor, düşük mekanik dayanıma sahip, esnek olmayan ve yüksek yoğunluğa sahip malzemeler olmalarıdır. Kompozit malzemeler tüm bu dezavantajlara sahip olan malzemelere alternatif olarak geliştirilmiştir. Ortopedik ve diş implantları genelde metal ve seramiklerden hazırlanırken, kalp-damar sistemi ve genel plastik cerrahi malzemeleri polimer, metal ve karbondan hazırlanmaktadır.

Polimerler çok değişik bileşimlerde ve şekillerde (lif, film, jel, boncuk, küre, nanopartikül) hazırlanabilmeleri nedeniyle biyomalzeme olarak geniş kullanım alanına sahiptirler.

2.10. Biyomalzemeler

Çok çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılan sistemleri imal edebilmek için geniş bir yelpazede özellik ve fonksiyon gerektiren malzemelere ihtiyaç duyulur ki bu malzemeler "biyomalzemeler" olarak adlandırılırlar. Genel anlamda biyomalzeme tanımı; tıp, cerrahi, dişçilik ve veterinerlik ya da hasta sağlığı için kullanılan medikal implant ve tek kullanımlık cihazların parçalarını oluşturan malzemeleri tanımlamak için kullanılır. Ancak "The National Institues of Health Consensus" gelişim konferansı biyomalzemeleri; "Vücudun herhangi bir dokusunu, organını veya fonksiyonunu, uzatmak ya da değiştirmek için herhangi bir zaman periyodunda, bir sistemin parçasını ya da bütününü teşkil etmekte kullanılan ilaç dışı sentetik veya organik madde veya madde kombinasyonu" olarak tanımlar [113]. Bu malzemelerin efektif olarak kullanılabilmeleri için; yerine göre difüzyon bariyeri olma, mekanik olarak güvenilir olma, kullanıldığı yere göre uyumlu mekanik özelliklere sahip olma, toksit veya kanserojen olmama, biyouygun (reaksiyon meydana getirmeme), biyoinert (vücut sıvısı içerisinde korozyona dayanıklı olma), normal fiziksel hareketlerde oluşan ani yüklere karşı dayanımlı olma, yeteri kadar yüksek yorulma dayanımına sahip olma gibi özelliklere sahip olmaları gereklidir. Bazı durumlarda biyomalzemelerin zamanla tamamen çözünmesi ve kapladıkları hacmi yeni büyüyen canlı dokuya bırakmaları da istenebilir. Tablo 2.5'de biyomalzelerden beklenen bazı özellikler gösterilmektedir.

Tablo 2.5. Biyomalzemelerin Özellikleri [114]

• Toksit veya kanserojen olmama
• Yeterli mekanik dayanıma sahip olma
• Vücutta meydana gelen reaksiyonların dışında reaksiyonlara sebep olmama
• Korozyona dayanmalı
• Zamanla çözünmesi isteniyorsa, çözünme hızı kontrol edilebilmeli

Günümüzde metal ve alaşımları, polimerleri ve seramikleri içeren sentetik biyomalzemeler biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Bu malzemeler değişik yapılarda olduklarından, her biri değişik özelliklere ve vücutta değişik kullanım alanlarına sahiptirler. Tablo 2.6'da biyomalzemelerin tıpta hangi alanlarda kullanıldıkları ve bu uygulamalara örnekler gösterilmektedir [114-116].

Tablo 2.6. Biyomalzemelerin Kullanım Yerleri [115]

Problem Alanı	Örnekler
• Hastalıklı ya da zarar görmüş kısımların değiştirilmesi	• Yapay kalça eklemi, böbrek diyaliz aleti
• İyileşmeye yardımcı	• Dikişler, Kemik vidaları
• Fonksiyon geliştirme	• Kontak lensler, pace maker
• Fonksiyonel anormalliği düzeltmek	• Harrington spinal çubukları
• Estetik problemi düzeltmek	• Çene Protezleri
• Tedaviye yardım	• Kateterler

Biyomalzeme, ilaçlar hariç tutulmak kaydıyla, herhangi bir madde veya sentetik ya da doğal maddelerin bir kombinasyonudur. Biyomalzemeler herhangi bir zaman periyodunda, herhangi bir doku, organ veya vücudun bir fonksiyonunu tedavi eden, destekleyen veya yerine geçen bir sistemin bütünü ya da sistemin bir parçasıdır.

2.10.1. Metalik Biyomalzemeler

Kristal yapıları ve sahip oldukları güçlü metalik bağlar nedeniyle üstün mekanik özellikler taşıyan metal ve metal alaşımlarının biyomalzeme alanındaki payı büyüktür. Bir yandan ortopedik uygulamalarda eklem protezi ve kemik yenileme malzemesi olarak kullanılırken, diğer yandan yüz ve çene cerrahisinde, örneğin diş implantı gibi, ya da kalp damar cerrahisinde yapay kalp parçaları, katater, vana ve kalp kapakçığı olarak da kullanılırlar. İnsan vücudunda kullanılmak üzere geliştirilen ilk metal Sherman-Vanadyum Çeliğidir. Biyomalzeme üretiminde kullanılan demir, bakır, krom, kobalt, nikel, titanyum, tantal, molibden ve vanadyum gibi çok sayıda metal, az miktarda kullanılmak koşuluyla canlı vücuduna uygunluk gösterir. Vücut içerisinde fazla miktarda bulunması zararlı olan bu metaller metabolizmik faaliyetler sırasında da oluşabilirler. Örneğin, kobaltın B12 vitamininden sentezlenmesi ya da demirin hücre fonksiyonu olarak meydana gelmesi gibi [117].

Metallerin saf halde kullanım uygunluğu çok nadirdir. Günümüzde başlıca üç metal grubu ve bunların değişik türevleri ortopedi ameliyatlarında fabrikasyon protez malzemesi olarak kullanılmaktadır. Bunlar paslanmaz çelikler, kobalt-krom esaslı alaşımlar ve titanyum alaşımlarıdır. Tablo 2.7'de bu alaşımların mekanik özellikleri verilmiştir. En yaygın olarak kullanılan saf ya da alaşım halindeki biyometaller ise; Co-Cr-Mo, Co-Cr-W-Ni, Ti-Al-V, Co-Ni-Cr-Mo-Ti alaşımları ile saf titanyum ve paslanmaz çelik çeşitleridir. Metal implant elementleri Tablo 2.7'de verilmiştir [118].

Asal metallerin dışında metaller yeryüzü kabuğunun içinde mineral halde bulunur ve kimyasal olarak diğer metallerle birleşmiş olurlar (Örneğin metal oksit gibi). Elde edilen işlenmemiş metal ürünleri ingot halde üreticilere verilir. Çoklu bileşen içeren metalik implant alaşımlarında, işlenmemiş metal ürünler daha fazla ön işleme tabi tutulacaktır (Yeniden eritme, alaşım elementlerinin eklenmesi ve katılaştırma gibi). Bu safhalardan sonra istenen kendine has kesin kimyasal özelliklere sahip alaşımlar elde edilebilir. Örneğin ASTM F138 316L paslanmaz çelik için, demir ile spesifik miktarda karbon, silikon, nikel ve krom alaşımlarıdır. ASTM F75 veya F90 alaşımı için kobalt ile spesifik miktarda krom, molibden, karbon, nikel ve diğer elementler alaşımlarıdır.

Tablo 2.7. Bazı metallerin mekanik özellikleri.

Malzeme	ASTM	Durum	Elastisite modülü (GPa)	Akma Mukavemeti (MPa)	Çekme Mukavemeti (MPa)	Yorulma Limiti (10^7 'lik döngü, R = -1 (MPa)
Paslanmaz Çelik	F745	Tavlanmış	190	221	483	221-280
	F55, F56, F138, F139	Tavlanmış	190	231	586	241-276
		30% Soğuk İşlenmiş	190	792	930	310-448
		Soğuk Dövülmüş	190	1213	1351	820
Co-Cr Alaşımı	F75	Ham Döküm/Tavlanmış	210	448-517	655-889	207-310
		P/M HIP[b]	253	841	1277	725-950
	F799	Sıcak Dövülmüş	210	896-1200	1399-1586	600-896
	F90	Tavlanmış	210	448-648	951-1220	-
		44% Soğuk işlenmiş	210	1606	1896	586
	F562	Sıcak Dövülmüş	232	965-1000	1206	500
		Soğuk İşlenmiş	232	1500	1795	689-793 (eksenel gerilme R = 0.05, 30Hz)
Ti Alaşımı	F67 F136	30% Soğuk İşlenmiş 4. Derece	110	485	760	300
		Dövülmüş, Tavlanmış	116	896	965	620
		Dövülmüş, Tavlı Sıcak İşlenmiş	116	1034	1103	620-689

İmplant üreticisi stok haldeki ilk malzemeyi alıp son safhadaki hale çevirir. Fabrikasyon metotları döküm, bilgisayar ve mekanik tabanlı (CAD-CAM), dövme, toz metalurjisi (sıcak izostatik presleme) ile zımparalayarak düzeltme ve perdahlama adımlarıdır. Son yıllarda implant üzerine mikro tabaka halinde porozlamak tercih edilen bir işlem oldu. Bu kemiğin içinde implantı fiksse etmek için kullanıldı. Mesela femoral kökün gövdeye yakın parçasına uygulanır. Sinterlemeye alternatif yüzey işlemleri de plazma veya implant yüzeyine alev püskürtmedir. Diger yüzey işlemleri de: iyon implantasyonu (daha iyi yüzey özelliklerine sahip olmak için) ve nitrürleme (yüksek enerjili nitrojen iyonları vakum altındaki implanta yönlendirilir) yapılabilir. Son

adımlar genellikle alışılmış olan yöntemlerdir (Kimyasal temizleme ve uygun asit içinde pasifizasyon gibi) [119].

2.10.2. Biyoseramikler ve Biyocamlar

Seramikler refrakter, polikristal, inorganik; silikatlar, metalik oksitler, karbürler ve çeşitli hidratlar, sülfitler, selenitler içeren malzemelerdir. Son yıllarda uzmanlar seramik ve çeşitli kompozitleri, özellikle kemik olmak üzere vücudun çeşitli kısımlarına dolgu yapmak ya da bazı kısımları değiştirmek amacıyla kullanılabileceğini fark etmiştirler. Bu amaçla kullanılan seramikler biyoseramik olarak isimlendirilirler. İmplant üretiminde kullanılan seramikler, emilemeyen (bağıl inert), biyoaktif ya da yüzey reaktif (yarı inert) ve biyoçözünür ya da emilebilen (inert olmayan) olarak sınıflandırılabilirler. Alümina, zirkonya, silisyum nitrürler ve karbonlar inert biyoseramikler, bazı camlar ve yoğun hidroksiapatitler yarı inert (biyoreaktif), kalsiyum fosfatlar ve kalsiyum alüminatlar emilebilen seramiklere örnek verilebilir. Seramik malzemelerin biyoseramik olarak sınıflandırılabilmeleri için, Tablo 2.8'deki özelliklere sahip olmaları gerekmektedir [118].

Tablo 2.8. İmplante Edilebilir Biyoseramiklerden Beklenen Özellikler [118]

1. Toksik Olmamalı
2. Kanserojen Olmamalı
3. Alerjik Olmamalı
4. Enfeksiyona Yol Açmamalı
5. Biyouygun Olmalı
6. Kullanım Ömrü Boyunca Fonksiyonel Olmalı

2.10.2.1. Seramik ve Cam Biyomalzemelerde Yapı Özellik İlişkisi

Seramik malzemeler metal ve ametal elementlerin iyonik ya da kovalent bağla birleşmesinden oluşurlar. Metalik bağın aksine, iyonik ve kovalent bağlarda elektronlar yapıyı oluşturan atom veya iyonların arasına yerleşmiş durumdadırlar. Bu durumun sonucu olarak seramik malzemeler iyi elektrik ve ısı yalıtımı özellikleri taşımaktadırlar. Ayrıca güçlü iyonik ve kovalent bağları, kayma düzlemlerinde atomların kaymalarını engelledikleri nden, bu malzemeler sert ve gevrektirler.

Tablo 2.9. Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Seramikler [116].

Seramikler	Kimyasal Formülü	Özellik
Alumina	Al_2O_3	Biyoinert
Zirkonya	ZrO_2	Biyoinert
Pirolitik Karbon		Biyoinert
Biyocam	$Na_2OCaOP_2O_3$-SiO	Biyoaktif
Hidroksilapatit (yüksek sıcaklıkta sinterlenmiş)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Biyoçözünür
Hidroksilapatit (düşük sıcaklıkta sinterlenmiş)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH_)_2$	Biyoçözünür
Trikalsyum fosfat	$Ca_3(PO_4)_2$	Biyoçözünür

Seramik malzemeler ufak deformasyon zorlamaları sonucunda bile hasar görebilir, ayrıca en ufak malzeme kusuru ya da çatlağa karşı çok duyarlıdırlar [116].

2.10.2.2. Seramiklerin Çözünmeleri (Degradation)

Korozyon şeklinde olmasa bile, seramik malzemeler fizyolojik ortamda değişik çözünmelere maruz kalabilirler. Biyoinert özellikleri ile tanınan alümina seramiğinin bile implantasyon sonrasında isteğe bağlı olarak zamanla çözünmeye uğraması sağlanabilir. Ayrıca biyoaktif olarak tanınan seramikler ve camlarda vücutta zamanla çözünebilir. Bu malzemeler sadece vücut içinde bileşimlerine bağlı olarak yavaş veya hızlı çözünmekle kalmaz; ayrıca kemik yapısında bulunan kalsiyum fosfat mineraline benzerlikleri sayesinde osteoklast kemik hücreleri tarafından emilebilirler [116].

2.10.2.3. Seramik ve Cam Malzemelerin Mekanik Özellikleri

Çok iyi basma dayanımları olmasına rağmen, seramik ve cam malzemeler düşük çekme veya eğme gerilmeleri altında bile hasara uğrarlar. Bu malzemeler arasında alümina iyi mekanik özellikleriyle öne çıkmasına rağmen alüminanın da çekme dayanımı hala metalik malzemelere oranla yetersizdir. Alüminanın diğer özellikleri üstün aşınma direnci ve düşük sürtünme katsayısıdır. Kalsiyum fosfatlar ve biyoaktif camlar çok düşük mekanik özellikleri yüzünden yük taşıyıcı implant uygulamaları için uygun değildirler. Özellikle hidroksiapatit, anatomik boşlukları doldurmak amaçlı yük taşımayan implantlarda kullanılmaktadır. Ayrıca bu malzeme metalik implantların üzerine kaplama malzemesi olarak kullanılarak kemikle implant bağının

güçlendirilmesi sağlanmıştır. Tablo 2.10'da bazı biyoseramik ve biyocam malzemelerin mekanik özellikleri gösterilmektedir [116].

Tablo 2.10. Seramik Biyomalzemelerin Mekanik Özellikleri [116]

Malzeme	**Young Modülü, E (GPa)**	**Basma Dayanımı, σ_{UCS} (MPa)**	**Kopma Dayanımı, σ_{UTS} (MPa)**
Alümina	380	4500	350
Biyocam-Seramik	22	500	56-83
Kalsiyum Fosfat	40-117	510-896	69-193
Pirolitik Karbon	18-28	517	280-560

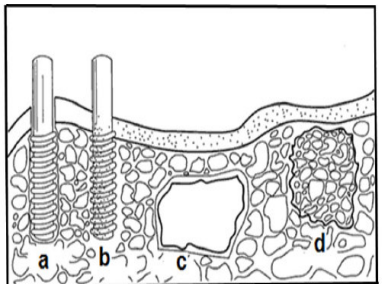
Biyoaktif camlar ve cam seramikler, vücut içerisindeki dokularla yararlı etkileşimde bulunan malzemelerdir. Bu malzemeler, kemiklere doğrudan bağlanabilme yeteneklerinden dolayı kemik grefti ve kemik dolgu malzemesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. 1970'lerde Hench tarafından keşfedilen çeşitli seramikler, cam seramikler ve camlar, kemik yedek parça biyomalzemesi olarak kullanılmaya başlanmıştır [120]. Bu malzemelerin kemik kaplama, kemik yapı kemik dokusuna girme gibi özelliklerinden dolayı klinik uygulamaları olmuştur [121, 122]. Biyoseramikler; genel olarak üç sınıfa ayrılır:

Biyoinert seramikler: Bu malzemeler, oksit seramikler, silika seramikler, karbon fiber ve sentetik elmastan oluşur. Biyolojik sistemle etkileşime girmezler. Kemik vidaları, plaklar, diz protezleri, diş implantları biyoinert seramik sınıfına girer.

Bağıl biyoinert seramikler vücut içeresinde fiziksel ve mekanik özelliklerini korurlar. Korozyon ve aşınmaya karşı dirençlidirler. Bazı bağıl biyoinert seramikler; alüminyum oksitler, zirkonya seramikler ve tek fazlı kalsiyum alüminatlardır. Bağıl biyoinert seramikler tipik olarak yapısal destek implantlarının yapımında kullanılırlar. Bu implantlara kemik plakaları, kemik vidaları ve femoral kafalar örnek olarak verilebilirler [123].

Biyoaktif seramikler: Biyoaktif seramikler, hidroksiapatit ve biyoaktif camlardan (ör: 45S5 Bioglass) oluşur. Dayanıklı maddelerdir. Kemiklerle ve bazı yumuşak dokularla kimyasal olarak bağlanabilir. İmplantın yüzeyi vücut içerisine girdiğinde değişime uğrar. Gözenekli, biyolojik olarak aktif katman kemik dokunun yeniden büyümesi ile şekillenir. Biyoaktif maddeler, biyolojik aktive yapıştırma ve kaplama için ideal maddelerdir.

Biyoayrışabilir seramikler: Hemen hemen tüm biyoayrışabilir camlar kalsiyum fosfat içerir. Vücuda implantasyonundan sonra niteli bozulan maddelerdir ve konakçı dokunun yenilenmesiyle aynı oranda değişir. Bu maddeler kemik onarımında kullanılabilirler ve kemik bu maddelerle işlevselliğini yeniden kazanır.



Şekil 2.13. Biyoaktivitelerine göre biyoseramiklerin sınıflandırılması

(a) biyoinert, (alümina dental implant), (b) biyoaktif, hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) metalik dental implant üzerine kaplanmış, (c) yüzey aktif biyocam veya A-W cam, (d) biyoayrışabilir tri-kalsiyum fosfat implant [$Ca_3(PO_4)_2$].

Biyoseramikler, polikristalin yapılı seramik (alümina ve hidroksiapatit), biyoaktif cam, biyoaktif cam seramikler ve biyoaktif kompozitler (polietilen-hidroksiapatit) şeklinde hazırlanabiliyor. İnorganik malzemelerin önemli bir grubunu oluşturan bu malzemeler, sağlık sektöründe çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktalar. Örneğin, gözlük camları, teşhis cihazları, termometreler, doku kültür kapları, endoskopide kullanılan fiber optikler, bunlar arasında sayılabilir. Çözünmez gözenekli camlar, enzim, antikor ve antijen taşıyıcı olarak da kullanılmaktadır. Mikroorganizmalara, sıcaklığa, çözücülere, pH değişimlerine ve yüksek basınçlara olan dirençleri bu uygulamalar açısından büyük avantaj sağlar. Biyoseramikler, diş tedavisi dışında da sert doku implantı olarak kullanılırlar Biyoseramikler, "biyoinert" ve "biyoaktif" olmak üzere iki grupta incelenebilir. Biyoaktif seramikler, doku ve implant arasında kimyasal bağ oluşumuna izin veren seramiklerdir. Yapısal işlevlerine göre de seramiklerin üç türünden söz edilebilir:

Oksit Seramikleri

Bunlar inert yapıda olan ve oksijen iyonlarının oluşturduğu düzlemde metal iyonlarının dağılmasıyla oluşan polikristalin seramiklerdir. İki önemli türü mevcuttur. Alümina (Al_2O_3) ve zirkonya (ZrO_2).

Alümina

Yüksek yoğunluk ve yüksek saflığa (>%99.5) sahip alümina, korozyon direnci, yüksek dayanımı ve iyi biyouyumluluk özelliğinden dolayı kalça protezlerinde ve diş implantlarında yaygın kullanıma sahiptir. Bu uygulamalarda kullanılan alüminanın çoğu, iyi tane yapısına sahip, polikristalin alfa-Al_2O_3'ün 1600-1700°C'de preslenmesi ve sinterlenmesi sonucu elde edilir. Alümina, 20 yılı aşkın süredir ortopedik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Zirkonya

Zirkonya, alümina gibi bulunduğu fiziksel ortam üzerinde inert etki gösterir. Alüminanın seramiklere göre avantajı çok daha yüksek çatlama ve bükülme direncine sahip olmasıdır. Zirkonya, uyluk kemiği protezlerinde başarıyla kullanılmaktadır. Ancak uygulamalarda üç önemli problemle karşılaşılmaktadır. Fizyolojik sıvılar nedeniyle zamanla gerilme sürecinin azalması; kaplama özelliklerinin zayıf oluşu ve potansiyel radyoaktif malzemeler içermesidir. Zirkonya içerisinde yarılanma ömrü çok uzun olan radyoaktif elementler bulunur (uranyum, toryum vb.). Bu elementleri yapıdan ayırmak çok zor ve pahalı işlemler gerektirir.

Kalsiyum-Fosfat Seramikleri

Kalsiyum fosfatlar; yapay kemik üretimi içi kullanılmaktadırlar. Bu malzemeler katı veya gözenekli (poroz) şekilde çeşitli greftlerin imali için ya da bu greftlerle implant kaplamaları için sentezlenmektedirler. Kalsiyum fosfatlar, içerdikleri Ca/P oranına, su miktarına, empüritelere ve ortam sıcaklığına göre hidroksiapatit veya β-trikalsiyum fosfat (whitlockite) gibi seramik kristalleri şeklinde üretilebilmektedirler. Bunlar; kalsiyum ve fosfat atomlarının çoklu oksitleri şeklindeki yapılardır. Hidroksiapatit $Ca_5(PO_4)OH$, Titanyum fosfat, $Ca_3(PO_4)OH_2$ (emilebilir) ve oktakalsiyum fosfat $CaH(PO_4)_{32}OH$ bu yapılara örnek verilebilir. Kalsiyum fosfat bazlı biyoseramikler tıpta ve dişçilikte 20 yıldan beri kullanılmaktadır. Bu malzemeler, ortopedik kaplamalar ve diş implantlarında, yüz kemiklerinde, kulak kemiklerinde, kalça ve diz protezlerinde "kemik tozu" olarak kullanılırlar. Kalsiyum fosfat seramiklerin sinterlenmesi genellikle 1000-1500°C arasında gerçekleşir ve bunu istenilen şekle sıkıştırılması izler. Tüm kalsiyum fosfat seramikleri değişen hızlarda biyolojik olarak bozunurlar.

Kalsiyum fosfat seramikleri, gözenekli yapıda da hazırlanabilirler. Gözenekli seramik implantların en büyük avantajı; kemik, seramik malzemenin gözenekleri içerisinde büyüdüğünde, oluşan ara yüzeyin mekanik açıdan yüksek kararlılığa sahip olmasıdır. Gözenekli implantlar kemik oluşumu için yapı iskeleti olarak kullanılırlar. Mercanların mikro yapısı, kontrollü gözenek

büyüklüğüne sahip seramiklerin oluşturulması açısından en ideal malzeme olmalarını sağlamaktadır. Gözenekli malzemeler, her zaman için yığın formlarında daha zayıftırlar ve artan gözeneklilige bağlı olarak, malzemenin dayanımı daha da azalmaktadır. Kemik kırıklarını doldurmak için gözenekli sentetik kalsiyum fosfat seramikler kullanılırken, diş implantlarında kaplama olarak gözenekli hidroksiapatit malzeme kullanılır.

Biyoaktif veya Yüzey Reaktif Seramikler

İmplantasyon sonrasında, yüzey reaktif seramikler kendilerine komşu olan dokular ile sağlam bağ oluşturabilirler. Yüzey reaktif seramiklere örnek olarak, camlar, biyocamlar ve hidroksiapatitler örnek olarak gösterilebilirler. İmplantasyon için kullanılan cam seramikler SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 ve Li_2O-ZnO-SiO_2 sistemleridir. Cam seramikler, camlar ve seramiklere göre birçok üstün özelliklere sahiptirler. Isıl genleşme katsayıları çok düşüktür, tipik olarak C derece başına 10-7 ile 10-5 cm arasında, hatta bazen negatif değerler bile olabilir. Ayrıca kontrol edilebilir tane büyüklüğü ve yüzey hasarlarına karşı iyi direnç göstermesi sayesinde, kopma gerilmeleri 100 MPa ile 200 MPa arasında olabilir. Cam seramiklerin en önemli dezavantajlar ise aşırı gevrek olmalarıdır. Biyouyumluluk nedeni ile bu malzemelerin mekanik dayanımları aşırı derecede arttırılamamaktadır, bu yüzden cam seramikler yük taşıyıcı bölgelerde tercih edilememektedirler. Cam seramiklerin, başlıca çimento olarak kemik dolgusu veya diğer malzemeler üzerine kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadırlar [157, 158].

Diğer Bazı Biyoseramikler

Belli başlı bazı seramik türleri dışında daha birçok seramik malzeme, biyomedikal uygulamalar için denenmekte ya da kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları titanyum oksit (TiO_2), kalsiyum titanat ($CaTiO_3$), baryum titanat ($BaTiO_3$) ve kalsiyum alüminattır ($CaO.Al_2O_3$). Titanyum oksit kemik çimentosu olarak denenmektedir. Poroz (gözenekli) kalsiyum alüminat ise implant sabitlemesi için dokunun gözeneklerini dolduracak şekilde oluşumunu uyarmak amacıyla denenmektedir. Baryum titanat ise tekstürlü yüzeyi sayesinde implant ile kemik arasında daha sağlam bir bağ oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca bu malzeme polarizasyon sonrasında piezoelektrik özelliği kazanır. Bu özellik sayesinde, bu malzeme kullanılarak yapılacak implantlara uygulanacak mekanik yüklemeler sonrasında elektrik sinyalleri ortaya çıkacaktır. Oluşan bu elektriğin kemiğin iyileşmesini ve içe büyümesini uyarma özelliği vardır. Bu yükler, uzuvlara uygulanan implantasyonlarda daha belirgindirler [124,127-130].

Cam ve Cam-Seramikler

Silika (SiO_2) temelli seramiklerdir. Cam seramikler Lityum/Alüminyum veya Magnezyum / Alüminyum kristalleri içeren camlardır. Biyocamda ise silika gruplarının bazıları kalsiyum, fosfor veya sodyum ile yer değiştirmiştir (SiO_2, Na_2O, CAO, P_2O_5). Böylece doku ve implant arasında kimyasal bağlanma gerçekleşir. Biyoseramikler, iskeletteki sert bağ dokusunun tamiri veya yenilenmesinde kullanılırlar. Bu malzemelere olan gereksinim, özellikle ilerleyen yaşa bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Yaşlılarda kemikler çok kırılgan olur; çünkü kemik yoğunluğu ve dayanımı 30 yaşından itibaren azalır. Bu azalma kadınlarda çok daha ciddi boyutlardadır. Çünkü menopoza bağlı olarak vücutta hormonal değişimler olmakta, bunun sonucunda da kemik üreten hücreler, yani osteoblastların yeni kemik üretiminde ve kemikte oluşan mikro çatlakların kapanmasındaki üretkenliği azalır. Ortalama insan ömrü 80 yıl olarak düşünülürse, 60 yaş civarında bağ dokusu için en azından 20 yıl boyunca biyoseramiklere gerek duyulmaktadır. Biyoseramiklerin kullanımını sınırlayan nedenlerin en önemlileri, bazı klinik uygulamalardaki yavaş ilerleyen çatlaklar, yorulma ve değişik darbe ve basınçlara dayanımlarının tam olarak bilinememesidir. Bu olumsuzlukları önlemek için kullanılan iki yeni yaklaşımdan birisi, biyoaktif kompozitler, diğeriyse biyoaktif seramiklerle yapılan kaplamalardır [131].

2.10.3. Polimerik Biyomalzemeler

Polimerik yapılar, doku mühendisliği uygulamalarından başarılı olabilmek için birçok kilit özelliğe sahip olmalıdırlar [110,112]. Bu özellikleri sıralayacak olursak;

- Yapı, vücuda yerleştirildikten sonra her hangi bir alerjik ya da toksik etki göstermemeli
- Kontrollü bozunma kinetiğine sahip biyouyumlu ve biyobozunur yapıya sahip olmalı
- Yapının kabul edilir raf ömrü olmalı
- Hücre bağlanması, büyümesi ve farklılaşması için uygun kimyasal yüzey özelliğine (üç boyutlu) sahip olmalı
- Uygulama esnasında hücrelerin büyümesine yardımcı olabilecek besinlerin ve yapıdan ayrılacak olan bozunma ürünlerinin geçişini sağlayacak gözeneklerin yapıda mevcut olması
- Yapının bozunma zamanı iyileşme ya da rejenerasyon proses süresi ile birbirini tamamlıyor olmalı
- Bozunma ürünleri toksik olmamalı, metabolize olabilmeli ve vücut tarafından temizlenebilmeli

- Yapı, uygulandığı ortama göre uygun mekanik özellikler sergilemeli
- Klinik olarak şekil ve boyut olarak hazırlanması kolay mimariye sahip olmalı

2.10.4. Kompozit Malzemeler

Birbirlerinin zayıf yönünü düzelterek üstün özelikler elde etmek amacıyla bir araya getirilmiş değişik tür malzemelerden ya da fazlardan oluşan malzeme sistemine kompozit malzeme denir. Cam elyaflı polyester levhalar, çelik donatılı beton elemanlar, otomobil lastikleri ve seramik metal karışımı olan sermentler bunlara örnektir.

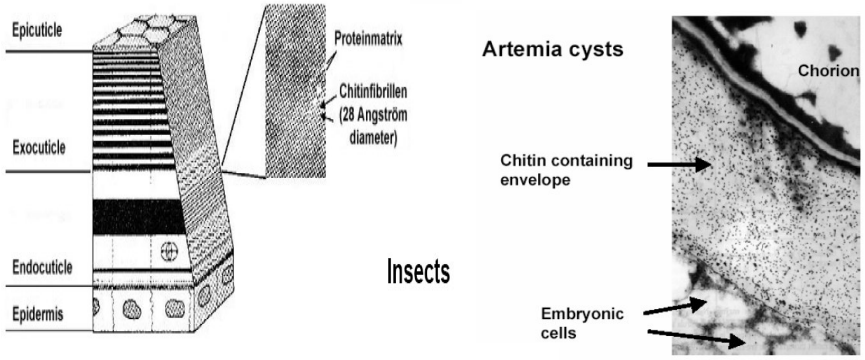
Doğal kemik gerçek bir nanokompozittir. Karmaşık ve vücudu oluşturan iskelete ait diğer dokulardan daha gelişmiştir. Kemik yalnızca mekanik dayanımı sağlamaz, bunun yanında özellikle kalsiyum ve fosfat açısından mineral deposudur. Ömrün başından sonunda kadar hiç yara izi bırakmaması kendini yenileme ve yeniden şekillendirme gibi eşsiz bir yeteneğin göstergesi, dokunun dinamik olduğunu gösteren bir örnektir. Bununla beraber travmatik ya da travmatik olmayan yıkımlardan oluşan kemik kusurları nedeniyle kemik greftleri (aşı) kullanılmaktadır. Yapay kemik aşısı ihtiyacı, kemikteki kusurun zorluğuna bağlıdır. Örneğin, kusur küçükse kemik birkaç haftada kendini yenileyebilme özeliğiyle iyileşecektir, bu durumda ameliyat gerekmeyecektir. Kusurun fazla olması durumunda, kemiğin gücünü kaybetmesinden dolayı kemik kendini iyileştiremeyecek ve zarar görmüş canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek için kemik aşısı gerekecektir. Kemik kusurunu tedavi etmek için otogreft ve allogreft gibi geleneksel yöntemler vardır. Otogreft; bir bireyde bir doku ya da organın aynı bireyde başka bir yere transfer edilmesi, allogreft ise aynı türde, genetik olarak benzemeyen bireyler arasında doku ya da organ transferidir. Her ne kadar otogreft ve allogreft klinik olarak uygulanıyor ve iyi sonuç veriyor olsa da bunların kullanımını kısıtlayan durumlar vardır. Örneğin otogreft sağlamak sınırlıdır ve allogreftle patojen taşınımı mümkündür. Bu durumda yapay kemik aşısı ihtiyacı olduğu açıktır. Günümüzde, otojenik ve allojenik kemiklere katılarak sorunları azaltmaya yetenekli, tek ya da çok fazlı yapay kemik aşı materyalleri sıkça kullanılmaktadır. Tek faz materyaller kemik büyümesinin gerektirdiği esas özelikleri her zaman sağlayamaz, ancak ideal kemik aşısı araştırmalarında öncü olur. Bundan dolayı, bileşim ve yapısal olarak doğal kemiğe benzer çok fazlı materyaller (kompozit) tasarlamaya gerçekten gereksinim duyulmaktadır. Son zamanlarda nanokompozitler, özellikle hidroksiapatit ve kolojen bazlı olanlar, sadece doğal kemiğe bileşim ve yapısal olarak benzerliklerinden değil, tek fazlı olanlara göre daha iyi bir mekanik dayanım sağlamalarından dolayı daha çok kullanılmaktadırlar. Ayrıca doğal kemiğin, yapısının da kolojen organik matrisleri içinde hidroksiapatit nanokristalleriyle oluşmuş nanokompozit olduğu dikkate alınarak, HA/kolojen nanokompozitinin kemik aşı materyali olarak seçilmesinin avantaj sağlayacağı açıktır [131].

2.10.4.1. Kompozitin Organik Kısmı (Biyobozunur Polimerler)

Biyobozunur polimerlerin en büyük avantajı vücuda yerleştirildiğinde zamanla vücutta hiçbir yapay madde kalmamasıdır. Biyobozunur polimerler ile kompozitleri sert doku onarımında dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Polimerik biyomalzemelerin kullanım yerlerine göre yapısal ve fonksiyonel özeliklerini uzun süre korumaları ya da belli bir süre fonksiyonlarını yerine getirmeleri istenebilir. Malzeme fonksiyonunu yerine getirdikten sonra vücuttan uzaklaştırılmalıdır ki bu da ikinci bir cerrahi operasyon gerektirdiğinden avantajlı değildir. Bu nedenle biyobozunur polimerler tercih edilmektedir. Biyobozunur polimer kullanılarak iyileşme sürecinde polimer bozunarak vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılabilen zararsız bileşenlere dönüşmektedir [132].

Doğada en fazla bulunan doğal biyopolimerlerden birisi kitosandır. Kitosan, bir çeşit polisakkarit olup kitinin deasetilenmesinden elde edilebileceği gibi kabuklu canlıların kabuklarından da ekstraksiyon yöntemiyle elde edilebilir[133].

Kitin, doğada selülozdan sonra en fazla bulunan ikinci biyopolimerdir. N-asetil-D-glukozaminden oluşmuş en önemli polisakkaritlerden biridir. Yapı olarak selülozunkine oldukça benzer bir yapıya sahiptir. Kitin yenilenebilir bir kaynaktır; çünkü böceklerin ve kabuklu deniz canlılarının iskelet yapılarının bileşiminde bulunur. Şekil 2.14.'de kitinin bazı kitin kaynaklarındaki yeri görülmektedir. Kabuklu deniz canlıları kitinin başlıca kaynağıdır ve genellikle yapılarında, % 30-40 protein, % 30-50 kalsiyum karbonat ile kalsiyum fosfat ve % 20-30 kitin bulunur. Yapılarındaki kitin kaynağına bağlı olarak % 40'a çıkabilmektedir. Kitin doğada genellikle, deniz yosunları, tek hücreliler (kamçılılar, amip kirpikliler vs.), selentereler, yumuşakçalar, eklembacaklılar, halkalılar, solucanlar, bakteriler, mantarlar, böcekler ve bazı bitkilerde bulunur. En zengin kitin kaynakları ise; dungeness yengeci, pasifik karidesi, ıstakoz ve kerevit (tatlısu ıstakozu) kabuklarıdır.



Şekil 2.14. Bazı kitin kaynaklarında kitinin yeri [134].

Kitinin deasetilenmiş bir türevi olan kitosan, katyonik bir polisakkarittir. Kitosan yapı olarak selüloza benzemektedir ve selüloz gibi bir fiberdir. Kabuklu hayvanların ve mantarların hücre duvarlarında kendiliğinden bulunan bir bileşendir. Kabuklu hayvanların atıkları, kuru kütle temeli üzerinden % 14-35 kitosan içerir ve yenilebilir deniz ürünü işletim endüstrileri yıllık 1.2 x 10^5 tondan fazla atık üretirler. Kitosan her ne kadar bol bulunsa ve birçok uygulamalara sahip olsa da sudaki sınırlı çözünürlüğünden dolayı birçok yararı yeni bulunmuştur. Kitosan, formik asit, asetik asit ve laktik asit gibi bazı asit çözeltilerinde tam çözünür ve polikatyonik polimer haline gelir [135].

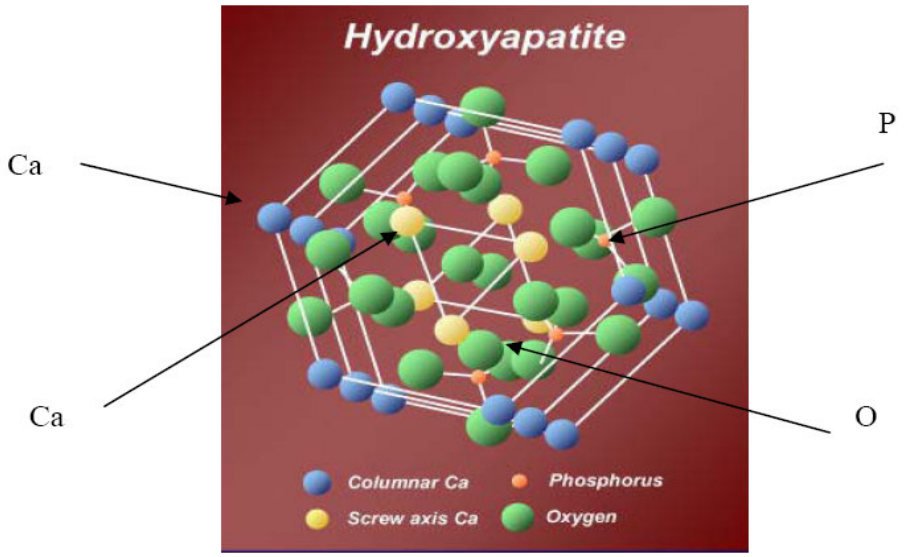
Kitosan; kozmetik, ilaç salımı, yara iyileştirme, implantasyon, atık su arıtımı, tarım, gıda, kağıt ve gen terapi uygulamalarında oldukça sık kullanılır. Kitosan nano parçacıkları antibakteriyal, antimikrobiyal ve antifungal etkilere sahiptir. Midede ilaç tahrişini önleyen ya da azaltan asit giderici ve antiülser etkileri de vardır[136].

2.10.4.2. Kompozitin İnorganik Kısmı

Biyomalzeme biliminde en önemli amaç katıları kemik tedavisinde kullanılabilecek malzemeler haline getirebilmektir. Kalsiyum fosfat bazlı seramik malzemeler biyoaktif ve biyouyumlu özeliklerinden dolayı önem taşımaktadırlar. Kalsiyum fosfat fazını hidroksiapatit (HA), ortakalsiyum fosfat (OCP, $Ca_8H_2(PO_4)_6$), trikalsiyum fosfat (TCP, $Ca_3(PO_4)_2$), dikalsiyum fosfat dihidrat (DCDP, $CaHPO_4.2H_2O$) ve dikalsiyum fosfat (DCP, $Ca_2P_2O_7$) oluşturmaktadır. Kemik destek malzemesi olarak en fazla HA ve TCP kullanılmaktadır [137].

2.10.5. Hidroksiapatit

HA, kalsiyum fosfat bazlı seramikler sınıfındandır ve doğal kemik mineraline kimyasal ve yapısal benzerliğinden dolayı kemik aşı malzemesi olarak kullanılmaktadır. Kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ve Ca/P oranı 1,67'dir [138]. HA yapısı şematik olarak Şekil 2.15'da gösterilmiştir.



Şekil 2.15. HA'in şematik olarak gösterimi [139].

HA tümör cerrahisinde kemikte oluşan boşlukta dolgu malzemesi olarak, kırık kemik onarımında kemikteki defekti kapamak için köprü olarak, dişçilikte diş kökünü beslemede ve implant kaplamalarında kullanılmaktadır. Yumuşak doku biyoaktif davranış gösteren HA ile bağlanarak yapışır ve implantın kaymasını engeller. Aynı zamanda vücut implantı yabancı madde olarak algılamaz. Hidroksiapatit kemik dolgu malzemesi olarak toz ya da poroz (gözenekli) blok şeklinde kullanılır. Hidroksiapatit aynı zamanda kemikteki boşluğu doldurarak boşlukta ödem oluşumunu ve yumuşak dokunun boşluğa girmesini engeller. Bir başka önemli görevi ise kalsiyum ve fosfat kaynağı olmasıdır. HA'nın yüksek osteoiletkenliği (yüzeyinde kemik oluşumuna izin verme) ve düşük bozunma hızı vardır.

Hidroksiapatit kemiğin temel inorganik bileşenidir ve iskeletin yeniden yapılanması için bir implant maddesidir. HA biyoimplant maddesi olarak kendisi tek başına ya da bir kompozit parçası olarak ilgi çekmektedir [140]. Hidroksiapatit mükemmel biyouyumluluğu ve biyoaktifliği nedeni ile kaplama malzemesi olarak birçok biyotıbbi uygulamada kullanılarak polimerin yapışmasını ve kemik oluşumunu artırmaktadır. HA sadece biyoaktif değil aynı zamanda ostekondüktif, toksik olmayan bir maddedir. Fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik özelikleri Tablo 2.11'de verilmiştir [138]. HA'nın kemik destek ya da onarım malzemesi olarak kullanımı için birçok yöntem geliştirilmiştir [141]. Bu yöntemlerden bazıları hidrotermal yöntem, yanma sentezi, sulu çözeltilerden çöktürme, sol-jel yöntemi, ultrasonik ışıma, yapay vücut sıvısından çöktürme, mikrodalga - hidrotermal yöntem ve ters misel yöntemidir. HA sentezi sırasında taneciklerin aglomerasyonu söz konusudur, bunu önlemek için kullanılan yöntemlerden biri de ses ötesi dalgalardır.

Tablo 2.11. HA'nın fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik özelikleri [139].

Özelik	Değer
Molekül formülü	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
Ca/P oranı	1,67
Kristal yapı	Hegzagonal
Young modülü (GPa)	80 – 110
Elastiklik modülü (GPa)	114
Basma dayanımı (MPa)	400 – 900
Gerilme dayanımı (MPa)	115 – 200
Yoğunluk (g/m^3)	3,16
Kırılma dayanımı ($MPa\ m^{1/2}$)	0,7 – 1,2
Sertlik (HV)	600
Bozunma sıcaklığı (^oC)	1000
Erime noktası (^oC)	1614
Dielektrik sabiti	7,40
Isıl iletkenlik (W/cmK)	0,013
Biyoaktiflik	Yüksek
Biyouygunluk	Yüksek
Biyobozunma	Düşük
Hücresel uygunluk	Yüksek
Kemik iletkenliği	Yüksek

Ses dalgaları, değişik ortamlar içinde yayılan boyuna dalgalardır. Bu dalgalar herhangi bir ortamda (katı, sıvı, gaz), ortamın özeliklerine bağlı olan bir hızla yayılırlar. Ses dalgası bir ortamda yayılırken ortamın parçacıkları, dalganın hareket doğrultusu boyunca yoğunluk ve hacim değişiklikleri üreterek titreşirler. Bu parçacık hareketi, dalga hareketinin yönüne dik olan enine dalga hareketindeki durumun tersidir. Ses dalgaları şeklinde ortaya çıkan yer değiştirmeler, denge konumundan itibaren her bir molekülün boyuna yer değiştirmesini gerektirir. Bu sıkışma ve genişleme, yüksek ve alçak basınç düşmelerine yol açar [142].

Frekanslarına göre boyuna mekanik dalgalar, işitilebilir (sonik), ses altı (infrasonik) ve ses ötesi (ultrasonik) dalgalar olmak üzere üç gruba ayrılır. İşitilebilir dalgalar, insan kulağının duyarlılık sınırı içinde olan ses dalgalarıdır. Bu dalgalar 20 Hz ile 20.000 Hz frekansları arasındadır. Bu sesler müzik aletleri, boğazdaki ses telleri ve hoparlör gibi değişik yollarla yaratılabilir. Ses altı dalgalar işitilebilir mertebenin altındaki frekansta olan boyuna dalgalardır. Deprem dalgaları bu dalgalara örnektir. Ses ötesi dalgalar işitilebilir mertebenin üstündeki

frekansta olan boyuna dalgalardır. Örneğin, bu dalgalar, bir kuartz kristaline alternatif elektrik alanın uygulanmasıyla elde edilebilirler. Bu yol ile, $6*10^{8}$ Hz (600 MHz) kadar yüksek ultrasonik frekanslar elde etmek mümkündür. Hava içinde bu frekansa denk gelen dalga boyu $5*10^{-5}$ cm'dir. Bu değer görünür ışık dalgalarının boyu ile aynı büyüklüktedir[143].

Ses ötesi dalgaların bazı uygulama alanları aşınma, temizleme, kesme, toz ayrışması, erozyon, metal yorulma testi, görüntüleme, metal boru çizimi, fizik tedavisi, kaynak, biyoteknoloji, polimerizasyon ve medikal kullanımı şeklindedir [144].

2.10.5.1. Kemik Dokusundaki Hidroksiapatit

İnsan kemiklerinin kortikal ve trabeküler kısımlarının matrisleri iki fazdan oluşmaktadır: Kalsiyum HA ve Trikalsiyum fosfat (TCP:$Ca_3(PO_4)_2$). Asıl faz olan doğal kalsiyum HA, kortikal kemiklerde %50'den az olmamak üzere gözenekli bir yapı oluşturur. Diğer yandan, trabeküler kemikler ise %75'in üzerinde gözenekliliğe sahip bir kafes yapısına sahiptirler. İnsan kemiklerindeki gözeneklerin boyutları, 100 ile 500 μm aralığında değişmekte ve doğal kemik iliği ile doldurulmuşlardır. Kemikler, dentin, diş minesi, HA, protein, diğer organik maddeler ve su içeren doğal kompozitlerdir. Diş minesi, bu dokular arasında en çok mineral içeren ve en sert dokudur. Kemik dokusunun mukavemeti, bütün bileşenlerinin ayrı ayrı mukavemetlerinden daha büyüktür. Kemik yapısındaki kolojen, esnek yapısıyla, HA'nın gevrek kırılmasını önlerken, HA, sertliğiyle kolojenin plastik deformasyon bölgesine girmesini engeller.

2.10.5.2. Hidroksiapatitin Biyouyumluluğu

HA'in en önemli özellikleri arasında mükemmel biyolojik uyumluluğu önde gelir. HA, sert dokularla direk kimyasal bağ kurar. HA partiküllerinin ya da gözenekli blokların kemiğe yerleştirilmesinde; yeni doku, 4–8 haftada şekillenir [145]. HA gözenekli yapısı; hücrelerin, gözeneklerin içine doğru büyümesinden dolayı, dokuların implante nüfuz etmesini sağlar. Ayrıca HA'nın yapısındaki gözenekler, bir kanallar sistemi gibi davranıp, kemik yapıya kanın ve diğer önemli vücut sıvılarının ulaşmasını sağlar. HA'nın emilimi yılda % 5-10 hızıyla gerçekleşir. Yapılan deneylerde HA implantların, öncelikle fibrovasküler doku ile kaplandığı ve zamanla bu dokudaki olgun lamellerin, kemiğe dönüştüğü tespit edilmiştir [146]. HA'nın ostekondüktif özellikleri de implantların kemiğe sıkı yapışmasına ortam ve olanak sağlar. Ayrıca HA'nın lokal büyüme faktörlerine, özellikle kemik proteinlerine karşı kuvvetli kimyasal bağlanma eğilimi olduğu saptanmıştır [147]. HA non-toksik (zehir etkisi olmayan) özelliklere sahip olması sayesinde meydana gelebilecek vücut reaksiyonları da minimumdur [148].

2.10.5.3. Hidroksiapatitin Üretim Yöntemleri

HA ilk kez kimyasal çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlenmiş olup, daha sonra, su-bazlı kalsiyum ve fosfat tuzları içeren çözeltilerden kimyasal çöktürme veya asit-baz titrasyonu gibi yöntemlerle elde edilebilmektedir [149, 150]. Üretim yöntemi, biyoseramiğin sert doku değişimi veya protezlerin birleştirilmesinde kullanılma durumuna göre farklılık gösterir. Sert doku yer değişimlerinde, çevre dokuların protezlere nüfuzu ve tutturulması için belirli oranda gözenekli olması istense de, gerekli olan en önemli özellik mukavemettir. Fakat protezin mukavemetinin, çevre kemik dokusunun mukavemetinden çok fazla olması, gerilme yığılması (stress shielding) denilen probleme neden olur. Biyoseramik malzemelerin mukavemeti, tamamen yoğunluğuyla doğru orantılıdır. Eğer bir biyoseramiğin mukavemetinin artması isteniyorsa, yoğunluk arttırıcı işlemlerden geçirilmelidir. Doku ve implant birleşimlerinde; gözeneklilige, dokunun gelişimi ve biyoseramiğin implant ile birleşmesi açısından önemlidir. Gözenekli malzemeler, yüksek alan/hacim oranına sahiptirler. Bu da biouyumluluğu sağlar. Gözenekli kalsiyum fosfat seramiklerin üretilmesi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır [151, 152]. Gözenekli seramik implantların en büyük avantajı; kemik, seramik malzemenin gözenekleri içerisinde büyüdüğünde, oluşan ara yüzeyin mekanik açıdan yüksek kararlılığa sahip olmasıdır. Gözenekli implantlar, kemik oluşumu için yapı malzemesi olarak da kullanılırlar. Mercanların mikro yapısı, kontrollü gözenek büyüklüğüne sahip seramiklerin oluşturulması açısından en ideal malzeme olmaktadır. Gözenekli malzemeler, her zaman için yığın formlarından daha zayıftır ve artan gözeneklilige bağlı olarak, malzemenin dayanımı daha da azalmaktadır. Gözenekler dokuların iç büyümesine de izin verirler. Dolayısıyla protezin desteklenme ve korunması sağlanır. Ayrıca, gözenekler bir kanal sistemi gibi davranarak, kemik içerisine kan ve diğer vücut sıvılarının ulaşımını sağlarlar. Fakat gözeneklilerin fazla olması mukavemeti düşürdüğünden optimum bir oran kullanılmalıdır.

Gözenekli biyoseramik üretiminde polimerik sünger metodu, köpük metodu, organik katkı malzemesi ekleme, jel ve kayma döküm, direkt konsolidasyon ve hidroliz yardımlı katılaştırma gibi yöntemler de kullanılmaktadır [149, 150]. Kalsiyum HA'i, nano-boyutlarda yüksek kimyasal homojenlik ve saflıkta seramik tozlar olarak, kalsiyum nitrat ve di-amonyum hidrojen fosfat tuzlarının, özgün bir kompozisyona sahip "Sentetik Vücut Sıvısı (SVS)" çözeltilerinde uygun oranlarda çözülmesi ile başlanarak, insan vücudu sıcaklığı olan 37°C'de, yine insan vücudu pH değeri 7.4 olan ve biyomimetik koşullarda yürütülen özgün bir kimyasal sentez yöntemi ile elde etmiştir [152].

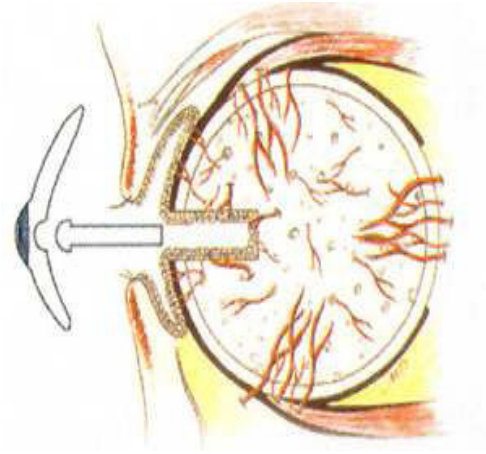
HA üretmek için bir ethylene glycol çözeltisi ($Ca(OAC)_2.xH_2O$) ve bir butanol çözeltisi (P_20_5) kullanmıştır. İşlem sırasında kullanılan, asetik asit (HOAC) ve amonyum nitrat (NH_4N0_3), dengeleyici ve oksitleyici olarak görev yapmıştır. Bu yöntem ile elde edilen HA'i, kaplamaların hazırlanması uygulamasında potansiyel olarak tanımlamaktadır [153]. HA seramiklerinin elyaflar

ile güçlendirilmesi sonucunda kırılma tokluklarının artırılması için; HA elyaflarını, ergitilmiş tuz sentezi (ETS) yöntemi kullanılarak ilk kez üretilmiştir [153].

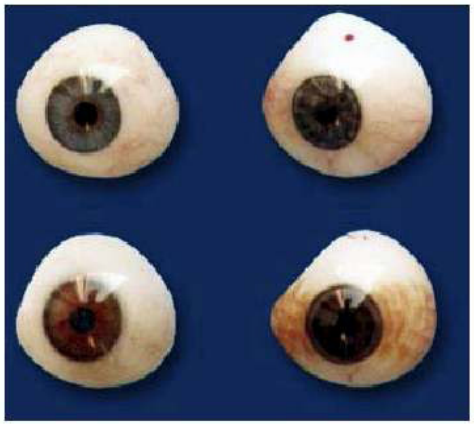
2.10.5.4. Hidroksiapatit'in Klinik Uygulamaları

Kemik greftleri iyi huylu kemik tümörlerinde ve kemik hasarlarında yama ve ekme şeklinde kullanılan standart cerrahi işlemlerden biridir. Kemik tümörlerinde yeniden yapılandırma işlemlerinde; insan, hayvan kaynaklı ve biyolojik esaslı olmayan malzemeler kullanılır. Bu uygulamada kullanılacak malzemenin, kolay üretilip elde edilebilen ve biyouygunluğu yüksek bir malzeme olması gereklidir. Toksik (zehir etkisi) olmamaları nedeniyle vücudu en alt düzeyde olumsuz etkileyen ve kemik grefti olarak kullanımlarda avantaj olarak sayılabilecek kimyasal ve fiziksel özelliklerin yanında, biyouyumlu oldukları için klinikte en çok kullanılan seramikler; HA ve TCP veya bunların kompozitlerini içeren kalsiyum fosfat seramiklerdir. TCP, klasik hızlı rezorbe olan Ca-P seramiğidir. Blok TCP'nin porları küçük ve arasındaki bağlantılar tam olmadığı için malzeme tümüyle rezorbe olmadan kemik oluşumu gerçekleşemez. Bu nedenle blok TCP iyi bir greft (yama) malzemesi değildir. HA, yavaş rezorbe (emilen-yok olan) olan klasik Ca-P seramiğidir. Blok HA *in-vivo* olarak stabildir ve yılda %5-10 oranında rezorbe olur. Blok HA fibrovaskuler (lifli ve damarsal) doku tarafından invaze (içine almak-yayınmak) olur ve daha sonradan matur (olgun) lameller kemiğe dönüşür [147]. HA'nın biyouygunluğu deneylerle kanıtlanmıştır. Bu deneylere dayanarak HA 1983 yılından itibaren kullanılmaktadır [145, 153]. Bu uygulamada kullanılan HA, 0.4–6 cm boyutlarında gözenekli bloklar halindedir. Bu bloklar %55–70 oranında gözeneklilige sahip olup, bu gözeneklerin boyu 200-300 μm civarındadır. Bu bloklar, 1100–1200°C arasında kurutulmuş ve yaklaşık 15 MPa'lık sıkıştırma mukavemetine sahiptirler. Uygulanacak bölgenin durumuna göre farklı boyutlarda bloklar kullanılır. Bu bloklar ameliyattan önce gaz-sterilize yöntemine tabi tutulurlar. HA blok ve granülleri, yığma yoluyla kemikteki boşluklara doldurulur. Yığma işlemi sonrasında granüllerin saçılmasını önlemek için bölgeye fibrin yapıştırıcı eklenir. Bu uygulamadaki en dikkat edilen özellik, kemik ile sıkı bir yapı oluşmasıdır [157].

HA'nın bir diğer kullanım alanı ise, Şekil 2.16'da görülen okuler implant uygulamasıdır [158]. Biyouygunluk ve toksik olmama gibi özellikler, HA'yı okuler implant uygulaması için ideal bir biyomalzeme yapmaktadır. Bu implantlarda kullanılan HA, 500 μm çapında, birbiriyle bağlantılı gözeneklere sahiptir. Bu gözenekler, dokuların iç büyüme gerçekleştirmesini ve dolayısıyla implantın göz boşluğuna tutunmasını sağlar. Sekil 2.17'de çeşitli türde yapay gözler görülmektedir [159].



Sekil 2.16. Hidroksiapatit oküler implant uygulanması [158].



Sekil 2.17. Çeşitli türde yapay gözler [159].

2.10.6. Trikalsiyum Fosfatlar

Üretim aşamasında Ca/P oranı 3/2 olarak sağlanırsa, sıvı ortamda $Ca(NO_3)$ ve NaH_2PO_4 karışımının çökeltilmesi ile β-trikalsiyum fosfat üretimi mümkündür. Trikalsiyum fosfat genelde, vücutta hisdroksiapatitten daha fazla çözünebilmektedir; bu ise implantasyon sonrasında kemiğin daha iyi büyümesini ve daha kolay yerini doldurabilmesine imkân verir [124, 160, 161].

2.11. Biyomalzemelerin Sol-Jel Yöntemiyle Üretilmesi

Bir çözeltide yeteri kadar mevcut olan monomerlerin aralıklı bir ağ oluşturarak kimyasal bağ yapmaları işlemine jelleşme ve makroskopik ölçekte ağ oluşturma durumuna 'jel' denir. Herhangi bir ağın bulunmadığı durum ise ‘sol’ olarak adlandırılır. Monomerlerin bir araya gelerek daha büyük moleküller oluşturması işlemine ise polimerizasyon denir. Polimerizasyon oluşurken monomerler arasında meydana gelen bağların sayısının mümkün olan tüm bağ sayısına oranı "dönüşüm faktörü, p", olarak adlandırılır. Bu oran zamanın bir fonksiyonudur. Bu oran, işlem sıcaklığına, monomer konsantrasyonuna ve bağ oluşumu için gerekli olan malzemelerin çapraz bağlanma kabiliyetlerine bağımlı olmasına rağmen, yapılan deneysel çalışmalar, sabit bir kompozisyonda başlar ve işlemi zamanın bir fonksiyonu olarak takip eder. Böylece kontrol altındaki işlemde kesin olarak tarif edilebilen bir 'jel' geçiş noktası vardır. Bu noktada makroskopik demetler oluşmaya başlar ve çözeltinin viskozitesi belirgin bir şekilde artar. Bu işlem sol-jel işlemi olarak tarif edilir [184].

Bir kolloid, yaklaşık olarak 1-1000 nm büyüklüğünde ve Van Der Walls kuvvetleri tarafından bertaraf edilen yerçekimi kuvvetinden etkilenmeyen bir süspansiyondur. Sol, bir sıvı içerisindeki katı parçacıkların kolloidal bir süspansiyonudur. Aerosol ise bir gaz içerisindeki

parçacıkların kolloidal bir süspansiyonudur Emülsiyon ise diğer bir sıvı içerisindeki sıvı damlacıklarının süspansiyonudur. Kolloidlerin tüm bu tipleri polimer ya da seramik parçacıkları oluşturmak için kullanılır. Seramik, metalik bir malzeme değildir ve inorganiktir. Böylece kristal olsun veya olmasın metal oksitleri, nitritleri ve karbonatlan seramik grubuna dâhil edebiliriz. Sol-jel işleminde metal ya da metaloid içeren kolloidin hazırlanması için kullanılan ön başlatıcı (precursor) elementlerinin çevresi çeşitli ligantlar tarafından sarılmıştır. En yaygın kullanılan ön başlatıcı tiplerinden birisi alkoksit grubudur. Bir alkan, sadece karbon ve hidrojen içeren ve birbirine tek bir bağ ile bağlanmış olan bir moleküldür. Metan (CH4) ve etan (C_2H_6) bu gruba örnek olarak verilebilir. Alkil bir liganttır ve metil ve etil örneğinde olduğu gibi alkan molekülünden bir hidrojen uzaklaştırarak üretilir [185].

Eğer inorganik sol ve jeller çeşitli metotlarla elde edilemez ise, sıvı bir ortamda çözünmüş kimyasal bileşenlerin reaksiyonu ile doğrudan üretilebilirler. İnorganik sol veya jel haliyle bir metal (M) katyonu içeren bir çözelti, kimyasal ön başlatıcı olarak adlandırılır. Ön başlatıcının kimyasal dönüşümü oldukça karmaşık ve sol durumdan katı duruma geçinceye kadar moleküler seviyede birçok karmaşık reaksiyonlar içerir. Aynı reaksiyonlar kolloidal parçacıkların bir sol içerisinde kontrollü dağılımını ve/veya onların jel içerisinde aglomerasyonunun kontrolünde sağlar.

Çözünebilen tüm ön başlatıcılar sol-jel işleminde kullanılabilir. Bu kapsamda kullanılan iki gurup öne çıkmaktadır; birincisi metal tuzları, ikincisi ise alkoksitlerdir. Metal tuzlarının genel formülü MmX_n şeklindedir. Burada M metal, X bir anyonik grup, m ve n de $AlCl_3$ örneğinde olduğu gibi stokiyometrik sabitlerdir. Alkoksitlerin genel formülü $M(OR)_n$ olarak verilir. Burada, aluminyum etoksit AlfOCaHs örneğinde olduğu gibi, (A) metal katyonu M, bir alkol grubu (OR) ile birleşmiş durumdadır. Bu iki grubun çözelti kimyası oldukça farklı olduğu için, ön başlatıcıya bağlı olarak, çözücü seçimi su veya bir organik çözücü olmak durumundadır [186].

2.11.1. Sol-Jel işleminde Kullanılan Çözücüler

Geleneksel olarak çözücüler, sıvı-sıvı faz ayrışmasını önlemek ve jelasyon kinetiğini kontrol etmek için, hidroliz işleminin başlangıç safhasında çözeltiye ilave edilir.

Çözücülerin çözelti içerisinde hangi oranlarda bulundukları da ayrıca önemlidir. Bu oranlar çözelti sonrasında meydana gelecek ürünün şeklini de belirlemektedir. Çözücünün çözebilme kabiliyeti göz önünde bulundurulduğunda, çözücülerin bazı önemli özellikleri şunlardır;

- Polarite
- Dipol momenti
- Kararlı olmayan protonların elverişliliğidir.

Polarite, polar ve nonpolar parçacıklar için çözündürme kabiliyetini belirler. Su, alkol ve formamid gibi daha fazla polar olan çözeltiler, sol-jel işleminde kullanılan silikat parçacıklarının çözündürülmesinde kullanılır. Dioksan ve tetrahidrofuran (THF) gibi daha az polar olan çözücüler ise alkil grubu ön başlatıcılarının çözündürülmesinde kullanılır. Metoksietanol ve etoksietanol gibi alkoller polar ve nonpolar davranış gösterirler ve polar ve nonpolar parçacıkların beraber bulunduğu çözeltide çözücü olarak kullanılma açısından çok elverişlidirler. Bir çözeltinin dipol momenti, bir parçacığa etrafındaki parçacıkların uyguladığı yükten dolayı oluşan parçacıklar arası mesafenin uzunluğunu belirler. Daha fazla dipol momenti olan çözeltilerde daha fazla parçacıklar arası mesafe var demektir. Kararlı olmayan protonların mevcut olup olmaması, parçacığın çözeltideki hidrojen bağlarına sıkıca bağlanarak kendi ilk bağlarından kopup çözelti içerisinde kolayca çözünüp çözünemeyeceğini gösterir. Çünkü hidroliz, hidroksil (pH>7) veya hidronyum (pH<7) iyonlarınca katalize edilir.

Göreceli olarak yüksek bir dielektrik sabiti, (s>40) çoğunlukla kalıcı dipol momentinin mevcudiyetinden dolayıdır. Bazı moleküller çok iyi iyonlaşma özelliğine sahiptirler ve diğer polar çözeltilerde çözünebilirler. Diğer taraftan çözücünün dielektrik sabiti göreceli olarak düşük olduğunda, zayıf bir iyonlaşma özelliği gösterecektir. Tablo 2.12'de sıkça kullanılan bazı çözücüler dielektrik sabitleri ile beraber verilmiştir.

Çözücüler bir proton değiştirdikleri zaman, protik, değiştiremedikleri zamanda aprotik olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca bir çözücü hem baz hem asit olarak davranabildiği zaman, amfoterik olarak adlandırılır.

2.11.2. Sol-Jel İşleminin Avantaj Ve Dezavantajları

Avantajları;

- Ham malzemelerden elde edilen iyi bir homojenlik
- Ham malzemelerden elde edilen iyi bir saflık
- Oldukça düşük hazırlama sıcaklığı:
  - Enerji tasarrufu
  - Minimum buharlaşma kayıpları
  - Minimum çevre kirlenmesi
  - Reaksiyon kabı ile reaksiyon olmadığı için saflık
  - Faz ayrışmasının olmaması
  - Kristalizasyonun olmaması
- Jel'in bazı kendine has özellikleri ile daha iyi cam ürünler
- Filmler gibi bazı istisnai ürünler

Dezavantajları;

- Ham malzemenin yüksek maliyeti
- İşlem sırasında büyük miktarlarda çekme
- Kalıcı ince gözenekler (Çoğu zaman)
- Kalıcı hidroksiller (Çoğu zaman)
- Kalıcı karbon (Çoğu zaman)
- Organik çözeltilerin sağlık üzerine yaptığı tahribat
- İşlem zamanının uzun olması

Tablo 2.12. Bazı çözücülerin dielektrik özellikleri [186].

Çözücü	Dielektrik sabiti (sr)	Tip
Aseton (C_3H_{60})	20.7	Aprotik
Asetik asit ($C_2H_4O_2$)	6.2	Protik
Amonyak (NH_3)	16.9	Protik
Benzen(C_6H<î)	2.3	Aprotik
Kloroform ($CHCl_3$)	4.8	Aprotik
Dimetilsülfoksit $(CH_3)_2SO$	4.5	Aprotik
DioksanfGtHgOa)	2.2	Aprotik
Su(H_20)	78.5	Protik
Metanol (CH_3OH)	32.6	Protik
Etanol (C_2H_5OH)	24.3	Protik
Formamit (CH_3ON)	110	Protik
Dimetilformamit (C_3H_7NO)	36.7	Aprotik
Nıtrobenzen ($C_6H_5NO_2$)	34.8	Aprotik
Tetrahidrofuran (C_4HgO)	7.3	Aprotik
Karbontetraklorid (CCl_4)	2.2	Aprotik
Dietileter ($C_4H_{10}O$)	4.3	Aprotik
Piridin (C_5H_5N)	14.2	Aprotik

2.11.3. Uygulama Alanları

Sol-jel işlemi monolitler, filmler, fiberler ve nano boyutlu tozlar gibi birçok malzemelerin üretiminde kullanılır. Diğer ticari metotlarla karşılaştırıldığı zaman, hammadde açısından ve üretim kapasitesi açısından, sol-jel metodu daha az miktarlara sahiptir. Fakat mikroyapı kontrolü, düşük işlem sıcaklığı, kompozisyon kontrolü gibi özelliklerinden dolayı, filtrasyon, yalıtım, ayrıştırma, sensörler ve antireflektör yüzeyler için oldukça avantajlıdır.

İnce Film Oluşturma (Kaplama İşlemi):

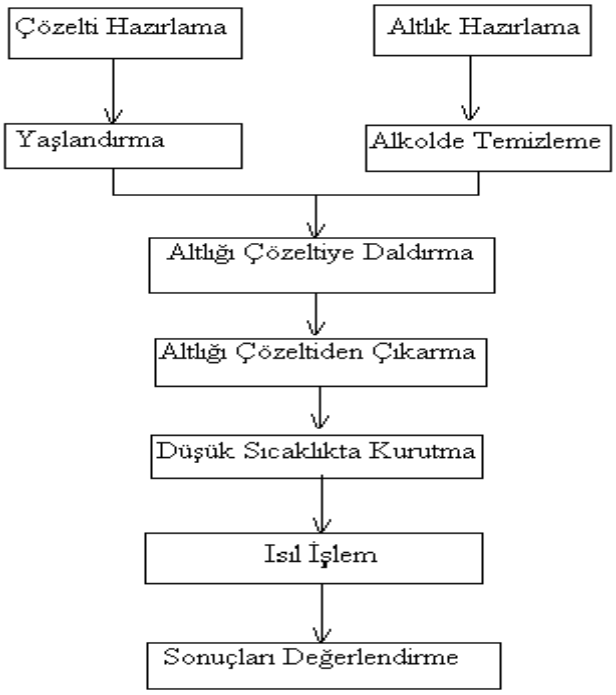
Filmler ve kaplamalar sol-jel işleminin ilk olarak keşfedildiği anlardaki uygulama alanlarıdır. Kalınlığı 1 mikrondan az olan ince filmler, küçük ölçeklerdeki numuneleri çözeltiye daldırarak veya çözeltide döndürerek sol- jel işlemi ile çatlaksız ve homojen olarak kaplanabilir. Ayrıca büyük altlıklar kullanılarak diğer ticari metotlarla kaplanması zor olan borular ve çubuklar kaplanabilir. İlk zamanlarda sol-jel işlemi optik uygulamalar için kullanılırken, son zamanlarda elektronik uygulamalarda, koruyucu kaplamalarda, membran yapımında ve algılayıcı uygulamalarında oldukça yoğun olarak kullanılmaktadır [185].

Akış diyagramı Şekil 2.18'de gösterilen ince film, altlık malzemenin çözelti içerisine daldırılması, çözeltinin altlık malzeme üzerine dökülmesi veya içine altlık daldırılan çözeltinin döndürülmesi sonucu, altlık yüzeyinde kalan çözeltinin kurutulması ile kaplanır.

Kaplanacak çözeltiye daldırılan altlık, çözeltiden yukarı doğru çekildiğinde, üzerinde bir miktar çözelti kalır. Altlık üzerinde kalan çözeltinin miktarı kaplama kalınlığını belirler. Daha fazla çözelti daha kalın kaplama demektir. Bu çözeltinin miktarı dolayısı ile kaplama kalınlığı, bir kaç etkene bağlıdır. Bunlar; kaplanan altlık üzerinde kalan sıvının viskozitesi, altlık üzerinde kalan sıvının yüzey gerilimi, altlık çözelti içinden çıktıktan sonra oluşan buharlaşma ve diğer etkileşimler sebebiyle meydana gelen yüzey gerilimi farklılığı ve eğer kurutma yüksek sıcaklıkta yapılıyorsa, altlığın çözeltiden çıkması ile fırına girmesi arasında geçen zamandır.

Çözeltinin ölçülebilen fiziksel özellikleri; viskozitesi, yüzey gerilimi ve jelleşinceye kadar geçen zamandır. Viskozite, dönen bir silindir vasıtası ile ölçülür. Çözeltinin akıcılığını kaybetmesi çözeltinin kompozisyonu ve katalizöre bağlıdır. Düşük sulu çözeltiler akıcılığını kaybetmeden önce viskozitede kademeli bir artış gösterirken yüksek oranda su içeren çözeltiler akıcılıklarını birden kaybederler.

Jelleşme zamanı ise gözlem yapılarak ölçülür. Çözeltinin akmayı durdurup dengeli kaldığı an bir kriter olarak alınır. Başka bir kriter ise kaplanmış yüzeye dokunulduğu zaman yüzeyin parmak izini göstermesidir.



Şekil 2.18. İnce film oluşumunda işlem basamaklarını gösteren akış diyagramı [185].

Elektronik Uygulamalar:

Yüksek sıcaklık süperietkenlerine, aktif elektronik ince filmler (iletken indiyum kalay oksitler (İTO) ve vanadyum perrtaoksit), ferroelektrik baryum, kurşun titanat ve PLZT, elektrokronik tungsten (VI) oksit ve titanyum oksit filmler gibi örnekler verilebilmektedir [187-191]. Fotoğrafik filmler üzerindeki statik elektriği azaltmak için, kaplanan vanadyum oksit ticari bir uygulamadır.

Ferroelektrik $BaTi0_3$ filmler ilk defa Fufushima tarafından 1975 yılında bulunmuş ve günümüze kadar oldukça yaygın uygulama alanı bulmuştur.

$BaTİC_3$ bulunduktan sonra kurşun titanat, kurşun zirkonat ve kurşun lantanyum zirkonat da sol-jel metodu ile üretilmeye başlanmıştır. Süperiletken $YBa_2Cu_30_7$ ve talyum bazlı süperiletkenlerinde sol-jel metodu ile üretimi birçok grup tarafından çalışılmaktadır. Hem ferroelektrik hemde süperiletken filmler sol-jel işlemi ile üretimi esnasında çatlak kontrolü, stokiyometri ve safsızlık kontrolü kolaylıkla yapılabilmektedir [192]. Fiziko kimyasal işlem esnasında epitaksiyel oluşum ya da çekirdekleşme, süperiletken filmlerde kritik akım yoğunluğu açısından oldukça önemlidir.

Koruyucu Filmler:

Koruyucu filmler korozyon ve aşınma direncini arttırır, malzemenin gerilme direncini arttırır ve malzemede pasifleşme ve yüzeyinde düzleşme sağlar.

Optik uygulamalara ek olarak, yüzey düzgünlüğü, mikroelektronik uygulamalar için kullanılan çoklu katman uygulamalarında da önemlidir. Sol-jel işleminin mikron boyutunda düzleştirme özellikleri bilindiğinden, aşınmış malzeme yüzeylerine sol-jel kaplama, yüzey kusurlarını azaltıp dayanımı arttırmada kullanılmaktadır [193].

Gözenekli filmler:

Gözenekli filmlerin gözenek hacmi, gözenek boyutu, yüzey alanı veya yüzey reaktifliği özel amaçlar için ayarlanabilir. Bu tip özellikler ön başlatıcı solların yaşlandırılması veya buharlaşma ve yoğunlaşma hızları kontrol edilerek sağlanabilir.

Diğer uygulamalar:

Yukarıda açıklanan uygulama alanlarına ek olarak sol-jel işlemi aşağıda kısaca açıklanan uygulamalarda da kullanılmaktadır:

- Aşındırma amacı ile kullanılan küresel ve karmaşık şekilli tozların üretiminde

- Tekstil makinalarının aşınmaya maruz kalan parçalarında mukavemetlendirici olarak kullanılan fiberlerin üretiminde

- Fiber ya da parçacık takviyeli kompozit malzemeler için, matriks malzeme üretiminde

- Yüksek yüzey alanına ve küçük gözenek boyutuna sahip inorganik gözenekli jellerin üretiminde kullanılmaktadır.

2.12. Biyouyumluluk

Biyomalzemeleri uzun veya kısa dönemli uygulamalarda vücut sıvısı, dokular veya organlarla temasa sokmak, biyouyumluluklarını değerlendirmeden mümkün değildir. Örneğin A.B.D' de 'The Food and Drug Administration (FDA) kurumundan onay almadan hiçbir cihaz veya malzeme biyomedikal uygulamalarda kullanılamaz [163]. Normalde insan vücudu, plastik, metal vb. gibi cisimleri içermediği için biyolojik sistemler açısından vücuda yabancı maddeler olarak algılanırlar. Dolayısıyla çeşitli etkilere sebep olmalarını beklemek normaldir. Hatta

virüslere, bakterilere, hastalıklara vb. karşı vücudun kendini savunma mekanizması olan bağışıklık sistemi bu yabancı maddelere karşı aktif hale gelebilir. Bu açıdan tıbbi uygulamalarda kullanılan malzemelerin vücuda uyumunu simgeleyen biyouyumluluk kavramı geliştirilmiştir.

Biyouyumluluk birçok farklı şekilde tarif edilmeye çalışılmıştır. Tarihsel olarak, başlangıçta, vücutta en az biyolojik tepki oluşturan malzemeler biyouyumlu olarak isimlendirilirdi. Bu eski tanıma göre biyouyumluluk tanımlanırken, özellikle vücudun biyomalzemeye karşı olan tepkisi esas alınırdı. Biyolojik ortamda malzemede oluşabilecek çözünmeler ve vücuda yayılabilecek zararlı yan ürünler ve bunların sonuçları bu ilk tanımda fazla dikkate alınmamıştır. Bu yüzden biyouyumluluk kavramı vücut ve biyomalzeme arasında karşılıklı etkileşimi kapsamalıdır. Günümüzde biyouyumluluğun tanımı ise şöyledir; "malzemenin belirli bir durumda ana dokunun verdiği cevabı vermesi" şeklindedir, böylece malzeme biyoinertliğin yanı sıra ayrıca pozitif bir etkide olmalıdır. Bu duruma bazı malzemelerin kemikle direk kimyasal bağ oluşturabilmeleri örnek gösterilebilir. Bu malzemelere ayrıca biyoaktif malzemeler de denebilir. Tablo 2.13'de biyouyumlu bir malzemeden beklenen bazı özellikler gösterilmektedir [164,165].

Tablo 2.13. Biyouyumlu Malzemelerin Özellikleri [165]

• Kemiğe hızlı adaptasyon
• Fibroz doku oluşturmaması
• Sağlam ve güvenilir kemik/implant ara yüzeyi sağlaması
• İyileşme süresini azaltması
• Ameliyatta oluşabilecek hataları tolere edebilmesi

2.12.1. Biyouyumluluğu Belirleyen Bazı Malzeme Özellikleri

Doku cevabını belirleyen malzeme özellikleri genelde malzeme yüzeyi tarafından belirlenir ki bunlar, malzeme yüzeyinin enerjisi, elektriksel yükü, nem oranı, pürüzlülüğü ve kimyası olabilir. Malzemenin inert olması, herhangi bir çözünmeye veya reaksiyona karşı dirençli olması anlamına gelir. Aksi halde malzeme yapısal bütünlüğünü zamanla kaybedebilir ve sonuçta çözünerek vücut sıvısı içerisinde dağılabilir. Eğer mevcut sistemde malzemenin inert olması isteniyorsa bu iyi bir sonuç değildir. Ama zamanla çözünerek yerini yeni büyüyen dokuya bırakması isteniyorsa çözünme ile oluşan ürünlerin biyolojik fonksiyonlar açısından problem teşkil etmemesi gerekmektedir. Eğer, ortaya çıkan ürünlerin komşu dokulara veya kan tarafından taşınarak vücudun çeşitli noktalarındaki doku ve organları ile etkileşimi istem dışı reaksiyonlar meydana getiriyorsa ve canlı dokulara zarar veriyorsa (osteolizis), malzemenin çözünmesi istenmez. Örneğin, metallerden metal iyonları veya korozyon ürünleri yayılabilir. Polimerlerden küçük moleküller,

parçacıklar, katı maddeler veya katalizörler yayılabilir. Bu malzemelerin hepsi vücuda yabancıdır ve mutlaka çeşitli etkileri olacaktır [163].

Biyomalzemelerin indirgenmesi, aşınması ve korozyonu sonucunda biyolojik uyumluluk etkilenebilir.

2.12.2. Vücudun Biyomalzemelere Tepkisi

Vücudun biyomalzemelere tepkisinde rol oynayan hücreler eritrosit, lökosit ve trombositlerdir. Eritrositler oksijen taşınmasında görev alırlar. Lökositler bağışıklık isteminde yer alan hücrelerdir. Lökositlerin alt tipi olan nötrofillerin fonksiyonu yabancı maddeleri içine almak ve yok etmek (yani fagositoz) olduğundan koruyucu mekanizma oluştururlar. Diger bir grup olan monositler de fagositik hücrelerdir. Bunlar kan dolaşımından dokuya geçtiğinde görünümünü değiştirerek makrofajlara dönüşür. Makrofajlar aktif olarak fagositoz yaparlar. Makrofaj fagositoz yaptıktan sonra diğer hücrelerle birleşerek dev hücre oluştururlar. Biyomalzemelerle ilgili olanı yabancı cisim ev hücresi olarak adlandırılır. Yabancı cisim hücrelerinin varlığı fagositik sistemin yabancı cismi yok etmede yeterli olmadığını gösterir. İnflamasyonun derecesine bağlı olarak doku harabiyeti oluşur ve normal dokunun kaybı, organ fonksiyonunun kaybı veya nemli kemik rezorbsiyonu ile sonuçlanabilir. Lökositlerin diğer bir alt grubu lenfositlerdir. Bunlar da immün sistemde rol alırlar. Trombositler ise pıhtılaşma mekanizmasında rol oynayan kan elemanlarıdır.

2.12.2.1. İnflamasyon

İnflamasyon, herhangi bir canlı dokunun doku yaralanmasına ilk cevabıdır. İnflamasyonun dört ana belirtisi vardır. Bunlar; kızarıklık, şislik, ısı artışı ve ağrıdır. Bu cevap hızlı ve normal bir cevaptır, fakat uzamışsa bir problem vardır. Yaralanma yerinde ilk olarak eritrositler gelirler daha sonra nötrofiller yaralanmadan sonraki 24 saat içinde örülürler ve 3-5 gün görülmeye devam ederler. Bu evre akut inflamasyon olarak adlandırılır. Yaralanma kaynağı ortadan kaldırılırsa cevap sonlanır ve doku normal görünüme döner. Eğer yaralanma kaynağı ortadan kaldırılmaz ve cevap devam ederse inflamasyon kronik inflamasyonun çeşitli evrelerine doğru ilerler. Bu devam eden cevapta nötrofiller yerlerini monosit / makrofaj serisinden oluşan büyük hücrelere bırakır. Bu hücreler de fagositiktir ve geri kalan doku debrisini ve savunma maddelerini temizlemeye çalışır. Görevlerini yapamadıklarında bir araya gelerek büyürler ve multinükleer dev hücreleri oluştururlar. Bu kronik inflamasyonu oluşturur ve genellikle doku veya organa zarar veren büyük doku debris kitlesiyle ilişkilidir [166, 167].

2.12.2.2. Biyomalzeme Kullanıldığı Durumlarda Vücudun Biyouyumluluk Özellikleri

İlk olarak biyomalzeme yerleştirilirken dokuya zarar gelir ve bir iltihap oluşur. Bunu yara iyileşme tepkisi takip eder. Eğer malzeme kısa bir süreliğine takılıp çıkarılırsa iyileşme normal bir şekilde gelişir. Ama eğer malzeme vücutta uzun süre kalırsa tepki değişir. Vücutta yabancı bir malzeme olduğundan normal doku iyileşmesi gerçekleşemez. Vücudun ilk reaksiyonu bu yabancı malzemeyi yok etmeye çalışmaktır. Fagositler gelirler ve normal görünen iltihap kronikleşir. Eğer fagositler tarafından yakalanabilir ve indirgenebilir bir malzeme değilse reaksiyon iki yoldan birini tercih edecektir. Bu iki yol iyileşme sürecinde genel tepki malzemenin çevresinde fibroz bir doku oluşturmaktır ki o malzemeyi vücudun kalan kısmından ayırsın. Genel olarak şöyle bir inanış vardır. Fibroz kapsül ne kadar ince olursa malzeme o kadar biyouyumluluğa sahiptir. Daha nadir görülen bir tepki ise iltihabın kronik şekilde devam etmesi sonucu, dev hücreler veya granülün oluşmasıdır. Bu olay malzeme biyouyumlu olmadığı zaman gerçekleşir ve konakçı doku o bölgeyi nötralize etmeye çalıştığında görülür. Vücudun malzemeye cevabı ile ilgili problemler oluşabilir. Deriye çok yakın implante edilen malzemelerde tepki fibroz katman oluşturup bu malzemeyi dış katmanlara taşımak şeklinde olacaktır. Bu sebeple malzemeleri epidermis ve dermisin içinde tutması zordur. Deriyi geçerek yerleştirilen malzemeler çevrelerinde fibroz bir katman oluştururlar ve epidermisle malzeme arasında temas biter. Böylece derinin koruyucu bariyer etkisi ortadan kalkar ve dış ortamdan derin dokulara doğru bir yol oluşur. Bu durumda enfeksiyon oluşumu kolaylaşır. Fibroz kapsülünün oluşumu malzemenin biyouyumlu olduğuna dair bir kanıttır ve iyileşmenin erken bir basamağı olarak oluşur. Fibroz kapsülün oluşumu genellikle porozlanmış malzemelerde gözlenmez. Eğer oyuklar yeteri kadar genişse lokal doku porların içine doğru büyüyecektir ve kapsül oluşturmayacaktı [166].

2.12.2.3. Enfeksiyon

Deride veya mukoz membranlarda bir harabiyet olup bakteri girişi olduğunda enfeksiyon riski gelişir. Enfeksiyon varlığı inflamasyonun sonlanmasını önler ve kronik inflamatuar cevap gelişir. Bu durumda da yara iyileşmesi tamamlanamayacak ve yoğun skar dokusu gelişecektir. Yabancı cismin enfeksiyon üzerindeki etkisi şöyledir: Deri veya mukoz membranlar implantın iyileştirilmesine bağlı olarak hasara uğrarlar. Hasar ve yabancı cisim varlığı inflamatuar cevabı başlatır. Malzeme dokunun içindedir ve yara iyileşmesi etkilenecektir. Bakterinin varlığı da zaten var olan problemlere eklenecektir. Çok iyi bilindiği gibi yabancı cismin bulunması enfeksiyon riskini büyük oranda artıracaktır ve enfeksiyon oluşturmak için gereken bakteri sayısını düşürecektir. Sadece enfeksiyon riski artmakla kalmayıp bunu tedavi etmek de güçleşecektir. Tedavinin tek yolu implantı çıkarmaktır. Sağlık harcamalarının büyük bir kısmını oluşturan

implantların yarattığı enfeksiyon problemi mikrobiyoloji, enfeksiyon hastalıkları, malzeme bilimi ve dizaynı, yüzey kaplaması ve cerrahi alanında çalışan pek çok kişiyi ilgilendirmektedir [168].

2.12.3. Seramiklerin Biyouyumluluğu

Al_2O_3 seramikler cerrahide kullanılan ilk seramik malzemeler olmuşlardır. Günümüzde de femur başı protezlerinde kullanılmaktadır. Biyouyumluluk testleri olumlu sonuçlar vermiştir. Hidroksiapatitlerin insandan alınan lenfosit doku kültürü üzerindeki çalışmalarda inert olduğu görülmüş ve klinik çalışmalar için uygun bulunmuştur [168]. Hidroksiapatitin serum sıvısı içindeki davranışının incelendiği bir araştırmada da sıvının malzeme ile reaksiyona girmediği gözlenmiştir [169].

2.12.4. Polimerlerin Biyouyumluluğu

Shunt ve Katater uygulamaları gibi vücutta kısa süre kullanılacak polimer çeşidi olarak olivinklorid kullanılırken parmak eklemi ve yumuşak doku yenilenmesi için poliaktid tercih edilir. Silikon ve polietilen gibi uzun dönemde biyouyumluluğunu bozmadan devam edebilecek az sayıda polimer çeşidi mevcuttur. Polimerlerin su ve yağ emme özelliği de biyouyumluluğunu etkileyen özellikleridir. Malzemenin histolojik doku uyumluluğu genellikle iyidir. Polimer malzeme tasarımın da malzeme aşınması üzerine etkisi vardır. Oral kalça protezin de acetabular yuva olarak kullanılan polimer aşınmalarını inceleyen bir çalışmada çimento ile sabitlenen acetabular yuvadaki polimer malzeme aşınmasının, vidalarla sabitlenenden daha az olduğu belirlenmiştir. Aşınma parçacıklarının çoğu bir bakteri büyüklüğünde yani birkaç μm kadardır ve fagositler tarafından kolayca çevrelenip indirgenebilirler. Polimerler genellikle ileri safhadaki indirgemelere dayanıklıdırlar [168, 170, 111].

Klinik olarak polimetilmetaklirat (PMMA, kemik çimentosu) ve silikon elastomerlere verilen hücre tabanlı tepkiler gösterilmiştir. Silikanın (SiO_2) uzun zamandır antijen adjuvan olduğu bilinmekteydi. Yani bir hayvan modelinde antijenle birlikte uygulandığında güçlü bir immün cevaba yol açabilir[168, 170, 111].

2.12.5. Metallerin Biyouyumluluğu

Metalik implantlar çevresindeki dokunun şekil ve yapısını olumsuz yönde etkileyebilirler. Protez yüzeyinin yapısı, tasarımı, biyomekanik faktörleri, cerrahi sebepleri enfeksiyon ve operasyon sonrası işlemler, metal iyonlarına karşı hassasiyeti, hastanın yaşı ve diğer hasta faktörleri biyouyumluluğu etkileyebilir. pH değeri 16 ve 17.7 olan çelikten elde edilen deney numuneleri farelerin omuz kaslarına yerleştirilip 4 ay sonra numune etrafındaki dokular analiz edilmiştir.

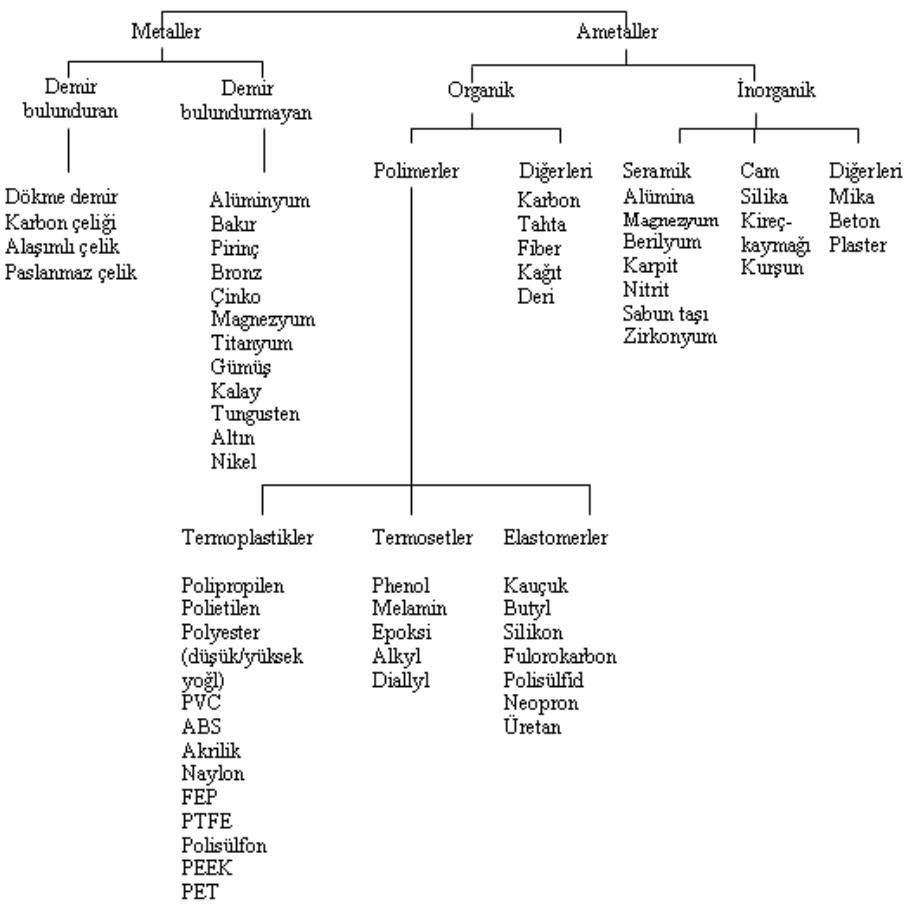
Östenitik paslanmaz çeliklerin protez malzemesi olarak kullanışı ASTM ve BSI standartlarına göre üretilmiştir. Alaşım pasif haldeyken dokuda iyi tolere edilmektedir. Fakat zamanla iyonların taşınması ile doku reaksiyonları başlamaktadır. Bu reaksiyonlar proteze direk temasla veya aşınma artıklarının ortama, ardından da vücut sıvılarına karışmasıyla oluşur. Fakat bu tür korozyonun gelişimi çoğu zaman protezin erken dönemde çıkarılmasına neden olacak boyutta değildir [173, 175].

2.13. Biyomalzemelerin Mekanik Özellikleri

Uygun malzeme seçiminin yapılabilmesi için her malzemenin iyice tanınması, mekanik özelliklerinin kavranması gerekmektedir. Tablo 2.14'de mühendislik malzemelerinin sınıflandırılması verilmiştir.

2.13.1. Mühendislik Malzemeleri

Tablo 2.14. Mühendislik malzemelerinin sınıflandırılması [176].



Mekanik özellikleri belirleyebilmenin en yaygın yolu, numuneyi çekme deneyine tabi tutmaktır. Bu malzemeleri ayrıca eğerek veya basmaya tabi tutarak da test edebilir. Belirli standart test protokolleri geliştirilmiştir. Bunların amacı değişik laboratuvarlardan gelen veriyi belli standartlara göre karşılaştırabilmektir. Mesela metallerin gerilmeyle ilgili testleri ASTM E8'e göre yapılmaktadır. Plastik malzemeler için de ASTM D.412 ve katı plastiklerin gerilmeyle ilgili testlerinde ise ASTM D.638 kullanılır.

Makina parçasını etkileyen dış kuvvetlerin doğurduğu iç kuvvetler parçada gerilmeler oluşturur. Parçadaki bu gerilmeler işletmede ortaya çıkarlar. Bu gerilmeler kuvvetin zorlamasına göre değişirler ve kuvvetin ismiyle adlandırılırlar. Kuvvetin zorlama biçimi, mukavemetin statik dalında öğrenilen bilgilerle belirlenir ve hesaplanır. Statikte cisimler rijit olarak kabul edilir. Gerçekte hiçbir cisim rijit değildir. Dış kuvvetlerin etkisi altında bütün cisimler biçimlerini az veya çok değiştirirler. Cisimlerin bu biçim değiştirmeleri kuvvetin etkisi kalktıktan sonra, ya tamamen kalkar ve cisimler eski ilk durumlarını alırlar veya biçim değişikliği az veya çok kalır. Cisimlerin biçimlerini geçici olarak değiştirip tekrar eski biçimlerine dönmelerine "elastik deformasyon" denir. Cisimlerin biçimlerinin kalıcı değişmeleri ise "plastik deformasyon" olarak adlandırılır.

Cisimlerin plastik değişmeleri, en büyük gerilme ve en büyük şekil değiştirme (deformasyon) değerleri bulunarak hesaplanır. Burada genel mukavemet kanunlarına göre hesaplanan gerilmelere genelde "nominal gerilme" adı verilir.

Gerilmeler:

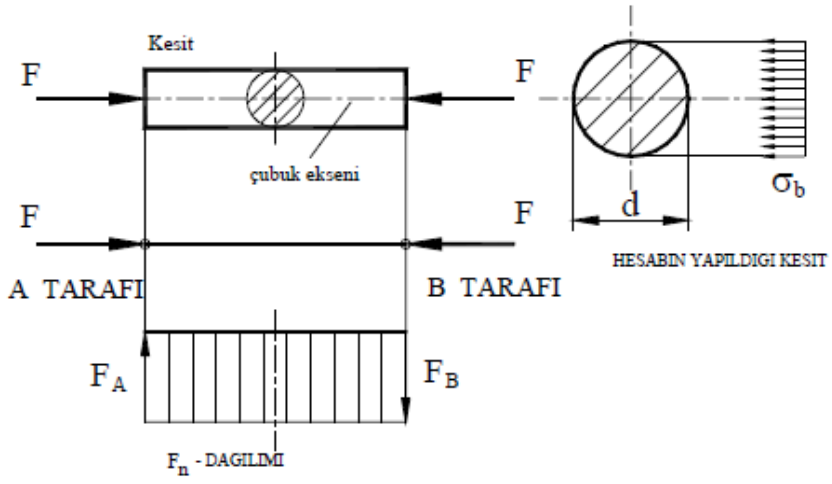
Gerilme kuvvetin fonksiyonudur. Kuvveti zorlama durumlarına ayırdığımıza göre, gerilmede kuvvete göre adlandırılacaktır. Kuvvet parçayı çeşitli şekillerde zorlayacaktır. Böylece "gerilmeler" ortaya çıkacaktır. Kuvvetin altı gerilme biçimine eşit olarak parçanında altı gerilme biçimi vardır. Böylece gerilme biçimlerini sıralayacak olursak:

- Çekme gerilmesi
- Basma gerilmesi
  - Basma
  - Yüzey basıncı ve cidar basıncı
  - Burkulma (*Flambaj*)
- Eğme gerilmesi
- Kesme gerilmesi
- Burulma gerilmesi, torsiyon
- Bileşik gerilme

2.13.2. Basma Gerilmesi

Basma kuvveti altındaki bir cisme iki ucundan eksenine paralel ve teorik olarak çubuğun eksenini etkileyecek biçimde, karşıt yönlerde, içeriye doğru aynı büyüklükteki kuvvetlerle yüklenmesi sonucu basma gerilmeleri oluşmaktadır. Cisim üzerinde kesit yöntemine göre gerilmeyi hesaplamak istersek, çubuğun hesap yapılacak yerinden bir kesit almamız gerekir. Bu kesiti eksene dik olarak aldığımızda ve etkileyen dış kuvveti kesite getirdiğimizde, kesitte yalnız kesite dik olarak etki eden bir tek F iç kuvveti oluşur. İç kuvvetlerin dengesine göre kesitte bu aksiyon kuvvetine karşı aynı büyüklükte bir reaksiyon kuvveti oluşacaktır. Böylece kesitte "basma kuvvet çifti" doğar. Bu kuvvet çifti kesitin iki yüzeyini birbirine doğru itmeye, yani bir birine doğru basmaya zorlayacaktır. Bunun içinde bu zorlanma biçimine kuvvette de olduğu gibi parçada "basmaya zorlanma" veya kısaca "basma" adı verilir. Bir yüzeye dik olarak etki eden kuvvete “basma kuvveti” ve bunun oluşturduğu gerilmeyede "basma gerilmesi" denir.

Şekil 2.20’de basma kuvvetine maruz kalan bir cismin üzerindeki kuvvet dağılımı ve basma gerilmesi hesaplarının yapıldığı kesit verilmektedir.



Şekil 2.20. Bir çubuk üzerine uygulanan basma gerilmesi.

$$\sigma_b = \frac{F_n}{A} \leq \sigma_{BEM}$$

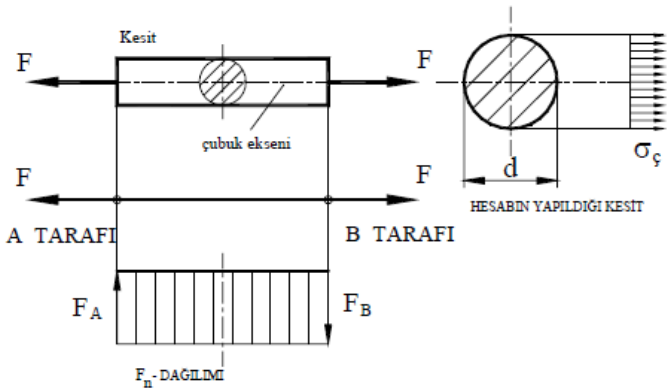
$$S_{he} = \frac{\sigma_{BSK}}{\sigma_b} \geq S_{GER}$$

Yukarıda verilen eşitliklerde basma kuvveti altındaki bir cismin basma gerilmesi ve emniyet katsayısı formülü verilmektedir. Burada σ_B basma gerilmesini, Fn uygulanan basma kuvvetini, σ_{BEM} malzemenin emniyetli basma mukavemetini, A kesit yüzeyi daire kesiti için $A = \pi d^2 / 4$ (daire çapı mm olarak) formülünü, S_{he} emniyet katsayısını, σ_{BSK} malzemenin şekline göre basma mukavemetini ve S_{GER} 1 olarak verilen gerekli emniyet katsayısını belirtmektedir.

2.13.3. Çekme Gerilmesi

Çekme gerilmesi bir cismin iki ucundan eksenine paralel ve teorik olarak çubuğun eksenini etkileyecek biçimde karşıt yönlerde ve aynı büyüklükte kuvvetlerle yüklenmesi sonucu açığa çıkan gerilme değerleridir. Kesit yöntemine göre bir cisimdeki gerilmeyi hesaplamada, cismin hesap yapılacak yerinden dış kuvveti eksene dik olarak alınan kesitten aldığımızda, yalnız kesite dik olarak etki eden bir tek F iç kuvveti oluşur. İç kuvvetlerin dengesine göre kesitte, bu aksiyon kuvvetine karşı aynı büyüklükte bir reaksiyon kuvveti oluşacaktır. Böylece bu kesitte "çekme kuvveti çifti" doğacaktır. Bu kuvvet çifti kesitin iki yüzeyini birbirinden ayırmaya, yani birbirini çekmeye zorlayacaktır. Bunun içinde parçanın bu zorlanma biçimine, uygulanan kuvvete "çekme kuvveti" denir. Bir yüzeye dik olarak etki eden kuvvete normal kuvvet ve bunun oluşturduğu gerilmeye de “çekme gerilmesi” denir.

Şekil 2.21’de bir çubuk üzerine uygulanan çekme kuvvet dağılımı ve hesaplamaların yapıldığı kesit bölgesi gösterilmektedir.



Şekil 2.21. Bir çubuk üzerine uygulanan basma gerilmesi.

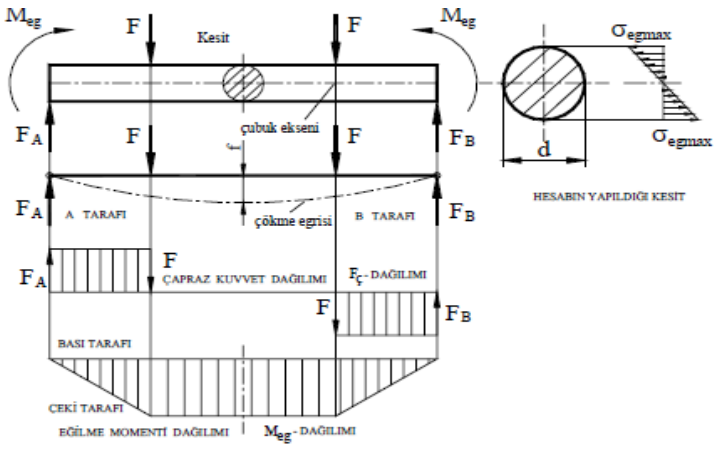
$$\sigma_ç = \frac{F_n}{A} \leq \sigma_{ÇEM}$$

$$S_{he} = \frac{\sigma_{ÇSK}}{\sigma_ç} \geq S_{GER}$$

$\sigma_ç$	N/mm^2	hesaplanan çekme gerilmesi
F_n	N	normal kuvvet
A	mm^2	kesit yüzeyi daire kesiti için $A = \pi d^2 / 4$ d daire çapı mm olarak
$\sigma_{ÇEM}$	N/mm^2	malzemenin emniyetli çekme mukavemeti
S_{he}	1	hesaplanan emniyet katsayısı
S_{GER}	1	gerekli emniyet katsayısı
$\sigma_{ÇSK}$	N/mm^2	malzemenin şekline göre çekme mukavemeti

2.13.4. Eğme Gerilmesi

Eğme gerilmesi bir cismin ekseninden geçen düzlem üzerinde ve iki ucundan, karşıt yönlerde etkileyen iki kuvvet uygulanarak elde edilen gerilmeye denir. Cismin hesap yapılacak yerinden dik olarak alınan kesitte uygulanan dış kuvvetlerin bu kesitin iki yüzünü birbirine karşı eğmeye zorlayacak ve cisim eğilecektir. Böylece kesitte "eğme kuvvet çifti" oluşur. Bunun için uygulanan kuvvete "eğme kuvveti" ve elde edilen gerilmeye de "eğme gerilmesi" adı verilir.



Şekil 2.22. Bir çubuk üzerine uygulanan eğme gerilmesi.

$$\sigma_{eg} = \frac{M_{eg}}{W_{eg}} \leq \sigma_{EGEM}$$

$$S_{he} = \frac{\sigma_{EGSK}}{\sigma_{eg}} \geq S_{GER}$$

σ_{eg}	N/mm^2	hesaplanan eğilme gerilmesi
M_{eg}	Nmm	eğilme momenti
W_{eg}	mm^3	eğilme için mukavemetmomenti. Daire kesiti için $W_{eg} = \pi\, d^3 / 32$
σ_{EGEM}	N/mm^2	malzemenin emniyetli eğilme mukavemeti
S_{he}	1	hesaplanan emniyet katsayısı
S_{GER}	1	gerekli emniyet katsayısı
σ_{EGSK}	N/mm^2	malzemenin şekillenmesine göre eğilme mukavemeti

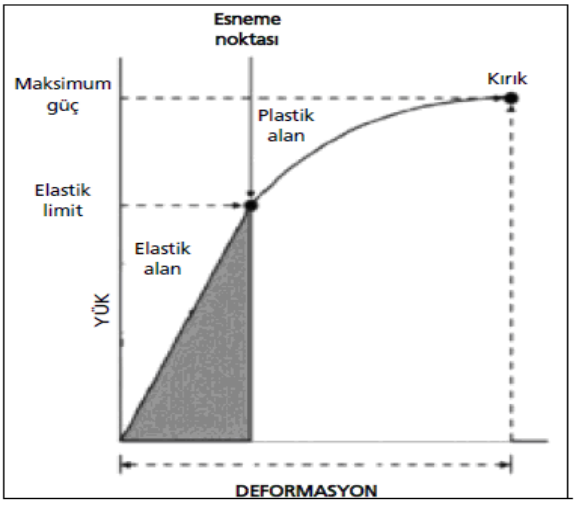
2.13.5. Kemiğin Biyomekanik Özellikleri

İnsan iskeletinin esas görevi kasların yapışmasına olanak sağlamak ve iç organları koruyarak desteklemektir. Kemiğin biyomekaniği de bu kompleks görevleri yapabilmesi için özelleşmiştir. Kemiklerin önemli bir fonksiyonu yük taşımalarıdır. Kırık, biyomekanik açıdan kemiğin yapısal yetersizliği olarak tanımlanabilir. Yetersizlik, kemiğe uygulanan yüklerin kemiğin yük taşıma kapasitesini aşması sonucu oluşur. Kemiğin yük taşıma kapasitesi; geometrisine (şekil, boyut ve kemik kütlesinin dağılımı), malzeme ozelliklerine (doku özellikleri) ve uygulanan yükün yönü ve büyüklüğüne bağlıdır [260, 261].

Kemik kırılganlığının biyomekanik açıdan tanımı en azından üç komponent içerir. Dayanıklılık veya güç, kırılabilirlik ya da deforme olma özelliği ve kemiğin kırılıncaya kadar absorbe ettiği enerji miktarıdır. Dördüncü bir parametre olarak sertlik sayılabilir. Ancak bu parametre kırılganlığın doğrudan bir ölçümü değildir. Bu parametreler, laboratuar şartlarında kompresyon, gerilme ve makaslama kuvvetleri oluşturan mekanik yüklenmeler verilerek yapılan biyomekanik testlerle ölçülebilir [262]. Kemik kırılganlığının doğasını anlamak için yapısal mekanik davranış ile malzeme mekanik davranışı arasındaki farkları bilmek önemlidir. Yapısal mekanik davranış kemiğin şekline, boyutuna ve doku özelliklerine bağlı iken materyal mekanik davranışı sadece kemiğin doku özelliklerine bağlıdır [263]. Herhangi bir fiziksel aktivite sonucu kemiğe uygulanan yükler, yapısal mekanik davranışın sonucu olarak kemikte deformasyona neden olur. Yük - deformasyon grafiğinin karakteristiği, kemiğin hem şekline hem de doku özelliklerine bağlıdır. Esneme noktasına kadar yük ve deformasyon arasında lineer bir ilişki (elastik bölge) vardır. Bu noktadan sonra yük deformasyon eğrisinin eğimi azalır (plastik bolge). Elastik bölgede yük kaldırıldığında kemik eski şekline geri dönerken plastik bölgede kemikte meydana gelen mikrohasar kalıcı deformasyona neden olur. Kemik elastik dönem boyunca yapılan yüklenmenin 6 katını plastik dönemde karşılayabilir. Yükler artırılarak uygulanmaya devam eder ve kemiğin yetersizlik noktasına ulaşılırsa kırık ortaya çıkar.

Yük - deformasyon eğrisinde, elastik bölgenin eğimi kemiğin sertliğini gösterir [261, 262, 264]. Kemik örneklerinde yapılan mekanik testlerde; uygulanan yükler altında kemiğin malzeme mekanik davranışının sonucu olarak yük – deformasyon grafiğine benzer gerilme- uzama grafiği elde edilir. Gerilme, yükün kemikte oluşturduğu iç kuvvetin yoğunluğu olup yükün uygulandığı alana oranı ile belirlenir. Uzama ise deformasyonun orjinal uzunluğa bölünmesi ile saptanır. Gerilme-Uzama eğrisinde elastik bölgenin eğimi ile belirlenen elastik (Young's) modülü kemik malzemesinin deformasyona direncini gösterir. Gerilme-Uzama grafiğinde eğrinin altında kalan alan dayanıklılık olarak adlandırılır ve kırık oluşuncaya kadar kemiğin absorbe edebileceği enerji miktarını gösterir [261, 265]. Kemik farklı yapısal bileşenleri içeren heterojen bir maddedir. Ayrıca kendini tamir edebilen, iç yapısını, şeklini ve boyutunu değişen mekanik ihtiyaçlara göre değiştirebilen bir dokudur (Wolff yasası) [262, 265]. Kemik dokusu farklı doğrultularda gelen yüklere farklı mekanik özellikler gösterir. Bu nedenle hem kortikal hem de trabeküler kemik anizotropiktir. Genel olarak, kemiğin uzun aksına paralel olarak gelen yüklenme ile dik olarak gelen yüklenmeye karşı gösterdiği mekanik özellik (dik gelen yüklere karşı olan elastik modülün paralel gelen yüklere karşı olanın 2/3'ü kadar) kemiğin mekanik davranışının sınırlarını çizer. Bu iki yön dışında kemiğe gelen yükler bu sınırlar içinde kalacak şekilde dirençle karşılaşır [261]. Kemik pimer yüklenme yönünde daha kuvvetlidir. Anizotropinin derecesi kemiğin anatomik yerine ve fonksiyonel yüklenmeye göre değişir. Vertebraya ait trabeküler kemik vertikal doğrultuda transvers doğrultuya göre daha güçlü iken iliak krest ve femur başının merkezine ait trabeküler

kemik hemen hemen izotropiktir. Kemik viskoelastik bir materyaldir. Bu nedenle daha hızlı yüklenme karşısında daha fazla enerji depolar, daha sert ve güçlü duruma gelir. Kortikal kemik trabeküler kemikten daha sert olup daha fazla yüke karşı koyabilir ancak deforme olabilme yeteneği daha azdır. Kortikal kemiğin kırılması için orjinal uzunluğunun %2'sinin aşılması yeterli iken, trabeküler kemikte bu oran %7'dir [266, 267].



Şekil 2.23. Eğme yüklemesi altında kemiğin standart yük-deformasyon eğrisi.

Tablo 2.15. Hidroksiapatitin mekanik özellikleri

Elastisite Modülü (GPa)	4.0-117
Basma Dayanımı (MPa)	294
Eğme Dayanımı (MPa)	147
Sertlik (GPa)	3,43
Poisson Oranı	0,27
Yoğunluk (teorik, gr/cm^3)	3,16

2.13.5. Hidroksiapatitin Biyomekaniği

Biyomalzemeler, insan vücudunun degişik bölgelerinde degişik kuvvet ve etkilere maruz kalmaktadır. Örnegin günlük aktiviteler sırasında kemiklere 4 MPa, tendonlara ise 40–80 MPa değerinde gerilmeler etki etmektedir. Bir kalça eklemindeki ortalama yük, vücut ağırlığının 3 katına kadar çıkabilir, sıçrama gibi faaliyetler sırasında bu deger vücut ağırlığının 10 katına kadar çıkabilir. Vücuttaki bu gerilmeler; ayakta durma, koşma, oturma gibi faaliyetler sırasında gün boyunca tekrarlanır. Bu tekrarlı hareketler biyomalzemelerin yorulmasına, çatlamasına ya da plastik deformasyonuna neden olabilmektedir [111].

Biyoseramik malzemelerin kırılma tokluğu ve yorulma dayanımı değerlerinin düşük olması nedeniyle, mekanik özellikleri yetersiz kalmaktadır. Biyoseramik malzemelerin basınca karşı dayanımları yüksektir. Bazı uygulamalarda çatlak oluşumu, yavaş ilerleyen çatlaklar ve yük tekrarı sonucu oluşan yorulma ise bir dezavantaj olarak ortaya çıkmaktadır. Yüksek yoğunluk ve yüksek saflıga (>% 99,5) sahip alümina, korozyon ve aşınma dayanımının yüksek oluşu, iyi yüzey özelligi ve biyouyumlulugu nedeniyle kalça protezlerinde ve diş implantlarında yaygın kullanıma sahiptir. Hidroksiapatit (HA), kalsiyum fosfattan oluşmuş gevrek bir biyoseramik malzeme olup, kırılma toklugu (KIC) 1.0 MPa.m½ yi geçmemektedir. İnsan kemiğinde ise, 2-12 MPa.m½ dir. Hidroksiapatitin mekanik özellikleri zayıftır, özellikle de yorulma dayanımı düşüktür. Çogunlukla titanyum, titanyum alaşımlarından ve paslanmaz çelikten yapılan implantların çevrelerindeki dokular ile biyouyumluluklarının arttırılması amacıyla kaplama malzemesi olarak da kullanılmaktadır. Kaplama yöntemi olarak en çok plazma püskürtme uygulanmaktadır [268].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

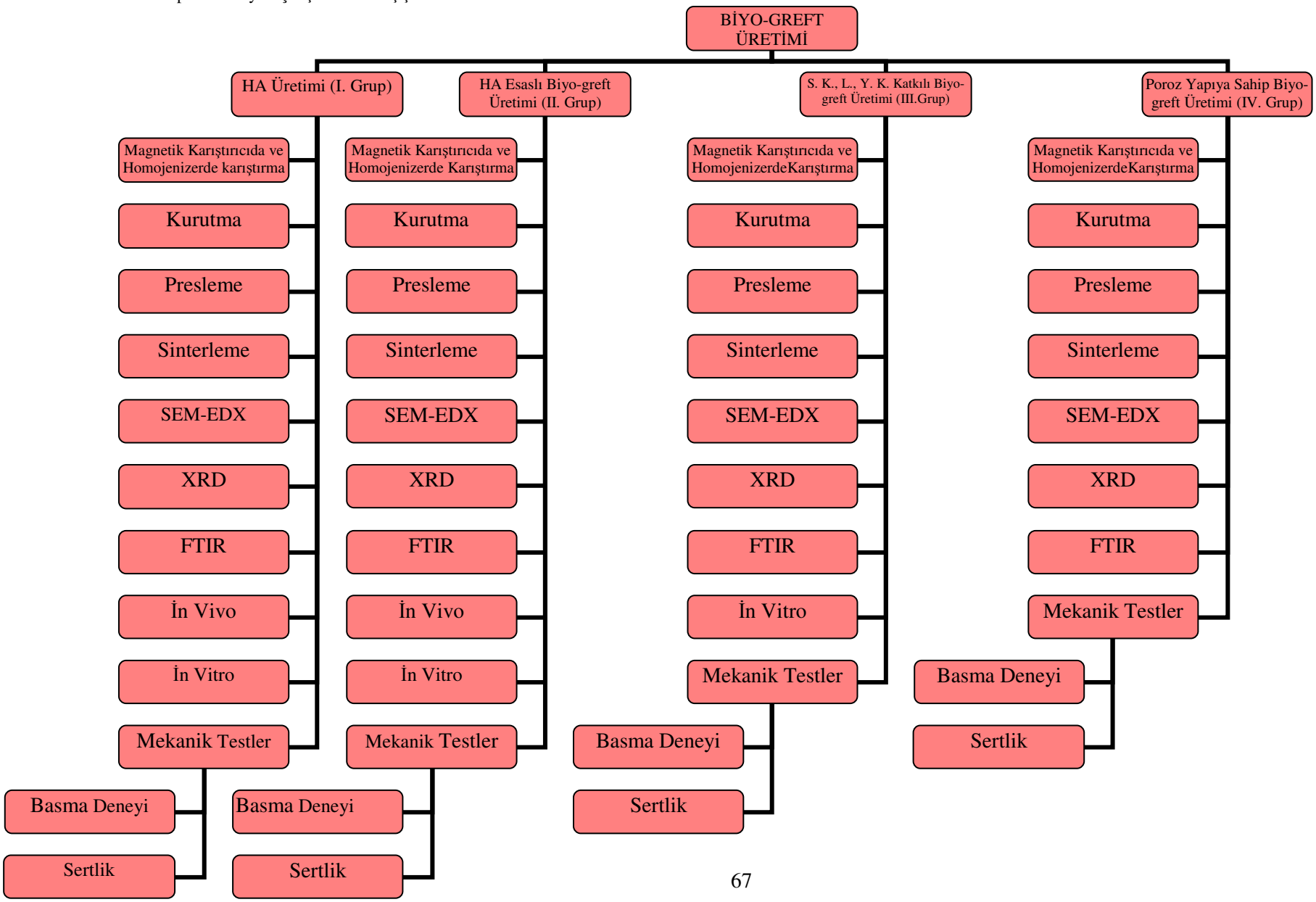
3.1. Kullanılan Malzemeler

Yüksek biyouyumluluğa ve yavaş bozunmaya (biyodegredasyona) sahip HA, kimyasal yapısı kemik mineraline benzer olduğundan dolayı bu tez çalışmasında üretilen alternatif biyo-greftlerin ana malzemesini oluşturmuştur. Bu nedenle, II ve IV. gruplar arasındaki HA esaslı biyo-greftlerin ana bileşen malzemelerinden biri olarak nano boyutta (<200nm) (Sigma;1306-06-5) ve mikron boyutta ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (Merck; LR 290280 L41) hidroksiapatit tozu kullanılmıştır. Biyocam ise %95 saflıkta olup (Merck) yüksek biyoaktifliğe ve biyouyumluluğa sahip olduğu için IV. grupta yer alan poroz yapıdaki biyo-greftlerin ana bileşen malzemelerinden biridir. II ve IV. gruplar arasında yer alan biyo-greftlerde katkı malzemesi olarak yer alan KH_2PO_4 (>%99,5 saflıkta, Merck-1.04873.0250), Na_2CO_3 (>%99,5 saflıkta, Sigma-497-198), CaO (%95 saflıkta, Carlo Erba-331567), P_2O_5 (%97,1 saflıkta, Merck-K33152940.418) difüzyon katsayısını, densifikasyonu ve sinterlenebilirliği arttırma özelliklerinden ve CaO ise mukavemeti, aglomerasyonu ve kristalizasyonu arttırabildiğinden dolayı tercih edilmiştir. Yttrium (%99,99 saflıkta, Sigma-205168) ve zirkonyum tozu (%99.5 saflıktaki Merck) yüksek mekanik özelliklere sahip olduğundan dolayı, II ve IV. gruplardaki biyo-greftlerde katkı malzemesi olarak kullanılmıştır. $CaCO_3$ içerikli doğal ürünlerin alternatif biyo-greftler üzerindeki etkilerini görmek amacıyla III ve IV. gruplar arasında sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkı malzemeleri kullanılmıştır. I. gruptaki HA sentezi için ise $Ca(OH)_2$ (Merck, %96) tuzu ve fosforik asit (H_3PO_4) (Merck, %99) kullanılmıştır. IV. grupta elde edilmek istenen poroz yapı oluşturmak için polimer bir malzeme olan jelatin (Merck) kullanılmıştır. Üretilen bütün biyo-greftlerin ticari greftlere karşılaştırmasını yapmak için, HA/TCP kompoziti sentetik granüllerden oluşan bir ticari kemik grefti (Onspine) kullanılmıştır.

3.2. Biyo-Greft Üretim Yöntemi

Deneysel çalışmalara başlamadan önce amaca uygun sistematik ve düzenli sonuçlar elde edebilmek için bir dizi üretim/test protokolü ile farklı greft malzemeler aynı ortam şartlarında tekrarlanarak karakterizasyonları FTIR, XRD, SEM-EDX, basma ve sertlik gibi üniversal cihazlarla yapılmıştır. Tez kapsamında yürütülen çalışmaların akış şeması Tablol 3.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Yapılan deneysel çalışmaların akış şeması.



3.3. Biyo-Greft Üretim Aşamaları

Yapılan deneysel çalışmalarda, sol-jel yöntemi kullanılarak 4 grupta alternatif biyo-greftler üretilmiştir. Sentezlenen biyo-greftlerin üretim aşamaları Tablo 3.1'de, kullanılan konsantrasyon malzemeleri ve oranları Tablo 3.2.-3.3 ve Tablo 3.6-3.7'de verilmektedir. Tablo 3.2, sol-jel yöntemiyle üretilen HA oranlarını, Tablo 3.3 ve Tablo 3.6.-3.7'de HA esaslı biyo-greftlerin kodları ve kullanılan bileşiklerin % oranlarını verilmektedir. I. grupta (Tablo 3.2) kalsiyum fosfat ve fosforik asit kullanılarak hidroksiapatit greftleri üretilmiş ve bu greftlerin pH değerleri NH_4OH çözeltisi kullanılarak değiştirilip (pH=5,7,9,12) pH farklılığının etkileri incelenmiştir. II. grupta HA ana malzemesiyle birlikte farklı oranlarda CaO, P_2O_5, KH_2PO_4 ve Na_2CO_3 katkı malzemeleri kullanılarak HA esaslı biyo-greftler üretilip, katkı malzemelerinin HA'in sinterlenebilirliği, kimyasal, fiziksel ve mekanik özellikleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. III. grupta (Tablo 3.3 ve Tablo 3.4) hidroksiapatit bileşiği ile birlikte sübye kemiği (cuttle fish), lületaşı ve yumurta kabuğu gibi doğal malzemeler ile CaO, P_2O_5, KH_2PO_4 ve Na_2CO_3 gibi katkı malzemeleri kullanılarak yeni biyo-greftler üretilip, I ve II. gruptaki biyo-greftlerle kıyaslanmıştır. III. grupta kompakt yapıda olan HA, lületaşı ve sübye kemiği esaslı bileşikler poroz yapıya dönüştürülüp morfolojik, kimyasal ve mekanik özellikleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla IV. grup üretilmiştir. Bunun için HA, biyocam, sübye kemiği ve lületaşı bileşiklerine, CaO, P_2O_5, KH_2PO_4 ve Na_2CO_3 gibi katkı malzemelerinin yanında jelatin bileşiği ilave edilerek poroz yapı elde edilmiştir. IV. grupta bulunan jelatin yüksek sıcaklıklarda yapıdan uzaklaştırılarak bulunduğu bölgelerde porlar oluşturulmuştur. Bütün biyo-greftlerin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla SEM-EDX, kimyasal ve fiziksel özelliklerini incelemek içinde XRD, FTIR analizleri yapılmıştır. Ayrıca biyouyumluluk ve toksik özellikleri in vivo ve in vitro analizleriyle ve mekanik özellikleri de sertlik ve basma testleri yapılarak incelenmiştir.

3.3.1. Hidroksiapatit Sentezi (I. Grup)

Apatit mineralleri çok geniş bir yelpazede farklı iyonlardan oluşmakta ve doğal olarak bulunmaktadır. Apatitlere çeşitli iyonlar eklenebildiğinden dolayı çok geniş bir uygulama alanına sahiptir [194-196]. Örneğin; $(HPO_4)^{2-}$ veya $(CO_3)^{2-}$ ilave edilmiş veya Ca^{2+} ve OH^- açısından eksik apatitler ($Ca_{10-x}[(PO_4)_{6-2x}(CO_3)_{2x}](OH)_2$, $Ca_{10-x}[(PO_4)_{6-2x}(CO_3)_{2x}]CO_3$, $Ca_{10-x}[(PO4)_{6-x}(HPO_4)_x](OH)_{2-x}$) biyomedikal alanda kullanılan apatitlerden bir kaçını içermektedir [197]. Biyomedikal alanda kullanılan bu apatitler arasında en öne çıkan ise hidroksiapatittir [198-200].

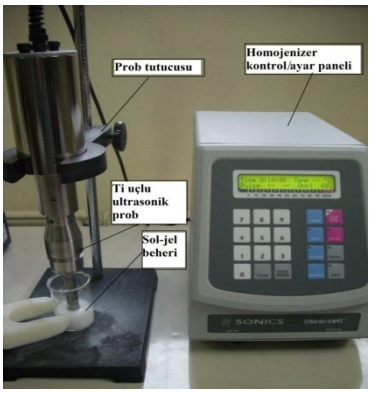
Bu deneysel çalışmalarda, I. grupta yer alan hidroksiapatit (HA) sentezi için kullanılan $Ca(OH)_2$ ve H_3PO_4 bileşiklerinin Ca/P sitokiyometrik oranı 1,67 olacak şekilde sabitlenmiştir.

Tablo 3.2. Sentezlenen greftlerin konsantrasyon oranları

NUMUNE	$Ca(OH)_2$(%)	H_3PO_4(%)	pH
N1-12	56	44	12
N1-5	56	44	5
N1-7	56	44	7
N1-9	56	44	9

N1-12: pH değeri değiştirilmeden üretilen HA numune**, N1-5:** pH değeri 5 yapılarak üretilen HA numune**, N1-7:** pH değeri 7 yapılarak üretilen HA numune; **N1-9:** pH değeri 9 yapılarak üretilen HA numune

Hidroksiapatit sentezi için önce; Tablo 3.2'de gösterildiği gibi 9.25 gr $Ca(OH)_2$ (Merck, %96) tuzu 27.9ml distile su ile çözülmüştür. Daha sonra 4.254 ml fosforik asit (H_3PO_4) (Merck, %99) solüsyonu $Ca(OH)_2$ solüsyonunun üzerine ilave edilmiştir. Bu solüsyon Ca/P oranı 1,67 olacak şekilde 40°C de 2 saat mağnetik karıştırıcıda, 60 °C de de 20 dakika homojenizerde karıştırılmıştır. Solüsyonun pH'ı 12 olarak ölçüldükten sonra, pH değeri fosforik asit ve NH_4OH ile 5-9 arasında değiştirilerek pH değişiminin greft üzerindeki etkileri incelenmiştir. Oluşturulan bu karışımlar 100 µm gözenekli kâğıt filtrede süzülmüş ve 1 gece oda sıcaklığında yaşlandırılmıştır. Daha sonra 340°C de 3 saat süre ile kurutulmuştur. Bütün biyo-greftler 3 kN/s hızla 24 N yük altında 15 mm çap, 10 mm yükseklikte silindir şeklinde tek yönlü isostatik preslenmiş ve 1180ºC de 2,5 saat 700 mmHg vakum atmosferinde sinterlenmiştir. Şekil 3.1'de ultrasonik homojenizerde sıvı halde karışmakta olan hidroksiapatit üretim safhası gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Ultrasonik homojenizasyon işlemi

3.3.2. Hidroksiapatit Esaslı Biyo-Greftlerin Hazırlanması (II. Grup)

HA esaslı biyo-greftlerin hazırlanması için kullanılan kimyasal bileşiklerin içerik, yüzde oranları ve pH değerleri Tablo 3.3'de verilmektedir.

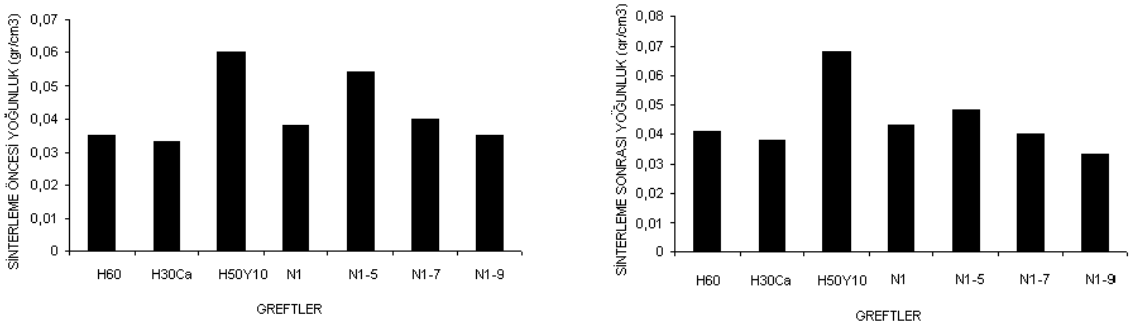
Tablo 3.3. HA esaslı biyo-greftlerin karışım yüzde oranları

NUMUNE	HAp(%)	KH_2PO_4(%)	NA_2CO_3(%)	P_2O_5(%)	CaO(%)	YTTRİA(%)	PEG	pH
H60	60	5	20	15	-	-	-	7,7
H30Ca	60	10	10	10	10	-	-	7,7
H50Y10	50	15	10	-	-	10	15	7,5

Kompozitlerin hazırlanması için ticari olarak temin edilen ve Tablo 3.2'de yüzde oranları verilen kimyasal bileşikler distile su (dw) ve etanol ile Ca/P oranı 1,67 olacak şekilde çözündürülmüştür. Daha sonra (P_2O_5 hariç) 400 rpm hızda 15 dak. magnetik olarak karıştırıldıktan sonra, homojen bir solüsyon elde etmek için 37°C de 30 dak % 35 Amplitude hızda bir ultrasonik homojenizerde parçacıkların homojen dağılması ve jelleşmesi için homojenize edilmiştir. P_2O_5 bileşiği ayrı bir beherde distile su ile çözündürüldükten sonra jel yapısını elde edebilmek için homojenizere ilave edilmiştir. Bütün alternatif biyo-greftlerin pH değeri 8,5-9 arasında ölçüldükten sonra solüsyonların beyaz jel yapısı değiştirilmeden fosforik asit kullanılarak Tablo 3.2'de verilen değerlerine getirilmiştir. Normal atmosferde 12 saat yaşlandırıldıktan sonra 120°C de 24 saat kül fırınında yine normal atmosferde kurutulmuştur. Daha sonra 3 kN/s hızla 24 N yük altında 15 mm çap, 10 mm yükseklikte silindir şeklinde tek yönlü isostatik preslenmiş ve 1180ºC'de 2,5 saat ve vakum atmosferinde (700 mmHg) sinterlenmiştir.

Tablo 3.4. I ve II. gruptaki biyo-greftlerin sinterleme öncesi ve sonrası ağırlık ve yoğunlukları

Biyogreft Kodları	Sinterleme Öncesi Biyogreftlerin Ağırlıkları (gr)	Sinterleme Sonrası Biyogreftlerin Ağırlıkları (gr)	Sinterleme Öncesi Biyogreftlerin Yoğunluğu (gr/cm^3)	Sinterleme Sonrası Biyogreftlerin Yoğunluğu (gr/cm^3)
H60	1.166	1.103	0,035	0,041
H30Ca	1.103	1.027	0,033	0,038
H50Y10	1.985	1.816	0,060	0,068
N1	1.280	1.135	0,038	0,043
N1-5	1.813	1.292	0,054	0,048
N1-7	1.321	1.064	0,040	0,040
N1-9	1.155	0.885	0,035	0,033

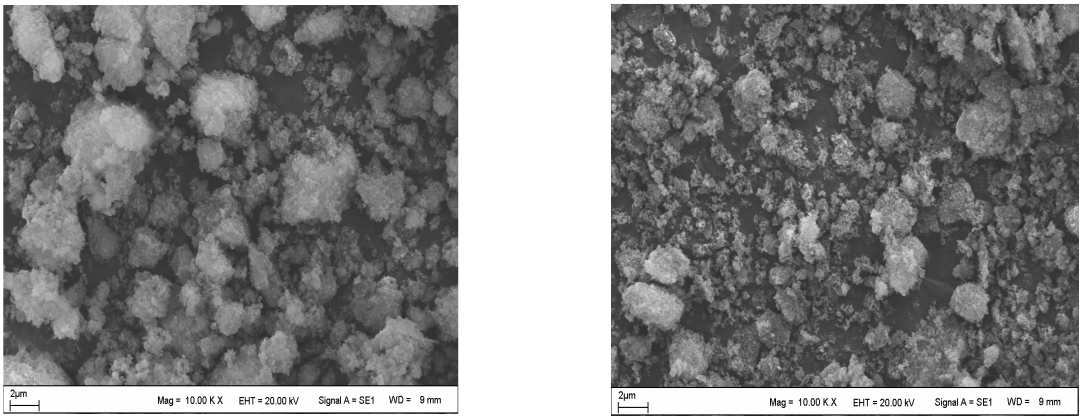


Şekil 3.2. I ve II. gruptaki biyo-greftlerin sinterleme öncesi ve sonrası yoğunluk grafikleri.

Tablo 3.4.'de ve Şekil 3.2.'de sinterleme öncesi ve sonrası HA esaslı alternatif biyo-greftler ile farklı pH değerlerine sahip HA sentez biyo-greftlerinin sinterleme öncesi ve sonrası yoğunluk değerleri verilmektedir.

3.3.3. Hidroksiapatit Esaslı ve Sübye Kemiği (Cuttle Fish), Lületaşı (Sepiolite) ve Yumurta Kabuğu (Eggs Shell) İçerikli Biyo-Greftlerin Üretilmesi (III. Grup)

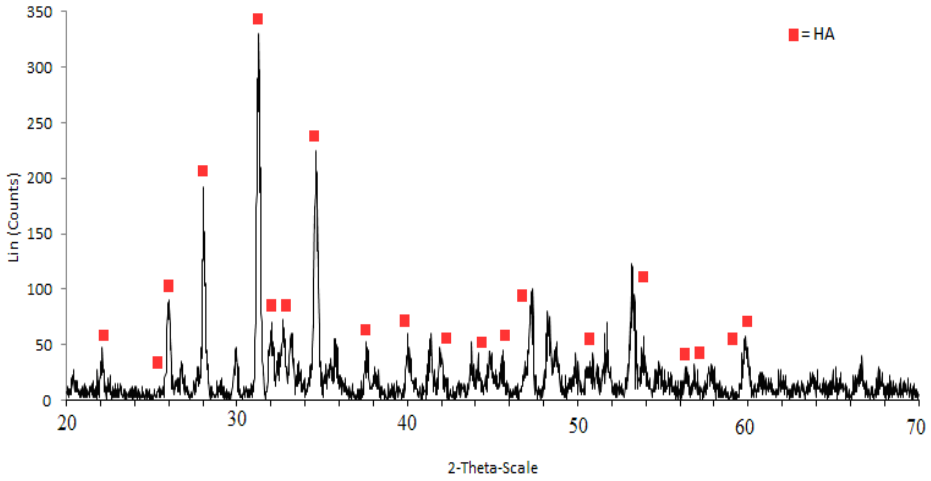
Hidroksiapatit (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), kemiğin mineral yapısına benzerliğiyle vücut tarafından kolayca kabul edilen, yüksek biyouyumluluğa sahip bir biyomalzeme olarak tıpta geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Kemik; kolajen ana faz içerisinde HA kristalleriyle desteklenmiş kompozit bir yapıdır. HA, kemik ve diş gibi doğal kaynaklardan doğrudan ayrıştırılabildiği gibi, sübye kemiği, yumurta kabuğu veya kalsiyum içeren doğal olmayan başka malzemelerin fosfat bileşiklerinden elde edilebilmektedir.



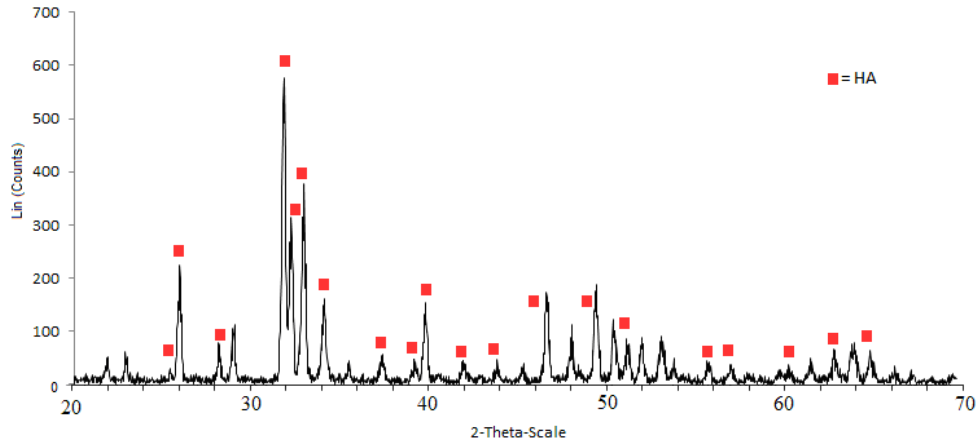
(a) (b)

Şekil 3.3. III. Grup biyo-greftlerin üretiminde kullanılan (a) mikron ve (b) nano boyuttaki HA tozlarının SEM görüntüleri

Mikron ve nano boyutlarda kullanılan HA bileşiğinin SEM görüntüleri Şekil 3.3 (a-b)'de verilmektedir. SEM görüntüleri toz halinde alınmış olup, mikron ve nano boyuttaki HA tozlarının boyut farklılıkları net olarak görülmektedir.



Şekil 3.4. III. Grup biyo-greftlerin üretiminde kullanılan mikron boyuttaki HA tozlarının XRD spektrumu



Şekil 3.5. III. Grup biyo-greftlerin üretiminde kullanılan nano boyuttaki HA tozlarının XRD spektrumu

Mikron ve nano boyutta HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftlerin üretiminde kullanılan HA tozlarının XRD spektrumları Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'de verilmektedir. XRD spektrumlarına göre, HA tozlarının benzer açı değerlerinde aynı fazlara sahip olduğu görülürken, nano boyuttaki tozların pik şiddetinin mikron boyuttaki tozların pik şiddetinden daha yüksek olduğu gözlenmektedir.

(a)

(b)

(c)

Şekil 3.6. (a) Sübye, (b) Sübye kemiği ve (c) Yumurta kabuğu resimleri.

Doğal kalsiyum fosfat ve karbonat içerikli sübye kemiği, tavuk yumurtası kabuğu ve lületaşı gibi doğal malzemeler kullanılarak HA esaslı kemik greftlerinin sentezi yapılmaya çalışılmıştır. Şekil 3.6'da görülen kemiği çıkartılmış sübyeler ve içi boşaltılmış yumurta kabukları suda yıkanıp, etanol içerisinde temizlendikten sonra içindeki nemi daha rahat yok etmek için 24 saat etil alkolde bekletilip yine 24 saat 120°C de kül fırınında normal atmosferde kurutulmuştur. Daha sonra havanda dövülerek Tablo 3.5.'de verilen mekanik öğütme öncesi (lületaşı 33,24 μm, yumurta kabuğu 600< ve sübye kemiği de 47,72 μm) tane boyutu değerlerine getirilip boyutları küçültülmüştür. Deneylerde kullanılan bir diğer malzeme olan lületaşı toz halinde Eskişehir'den temin edilmiştir. Lületaşı, sübye kemiği ve yumurta kabuğu tozu ile daha sonra mekanik öğütme yapılarak boyutları (lületaşı 9,81 μm, yumurta kabuğu 9,40 ve sübye kemiği de 14 μm) tamamen küçültülmüştür. Bu tozlara 2 lt hacimli seramik kavanozlarda alümina bilye kullanılarak 24 saat süresince sulu öğütme yapılıp boyutları Tablo 3.5.'de verilen değerlere getirilmiştir. Mekanik öğütme sırasında kullanılan 2 lt hacimli seramik kavanozların 1/3'ü bilye, 1/3'ü numune ve 1/3'ü boşluk olacak şekilde doldurulup etil alkol ile sulu bir şekilde öğütülmüştür.

Tablo 3.5. Greft üretiminde kullanılacak olan sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu malzemelerinin öğütme şartları.

Numune	**Numune Miktarı (gr)**	**Etil Alkol Oranı (cc)**	**Alümina Bilya Adedi ve Çapları**	**Numunelerin Mekanik Öğütme Öncesi Tane Boyutu (μm)**	**Numunelerin Mekanik Öğütme Sonrası Tane Boyutu (μm)**	**Öğütme süresi (saat)**
Lületaşı Tozu	~118	1000	Büyük bilya (Φ 20-25 mm)-16 adet Orta Bilya (Φ18mm) -18 adet Küçük Bilya (Φ15 mm) - 21 adet	33.24	9.81	24
Yumurta Kabuğu Tozu	~118	500	Büyük bilya (Φ 20-25 mm)-16 adet Orta Bilya (Φ18mm) -18 adet Küçük Bilya (Φ15 mm) - 21 adet	600<	9.40	24
Sübye Kemiği Tozu	~118	500	Büyük bilya (Φ 20-25 mm)-16 adet Orta Bilya (Φ18mm) -18 adet Küçük Bilya (Φ15 mm) - 21 adet	47.72	14	24

Tablo 3.6. Sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu malzemeleri kullanılarak üretilen alternatif biyo-greft sentez malzemelerinin yüzde oranları ve üretim şartları.

Biyo-greft Kodları	HA (%)	CaO (%)	KH_2PO_4 (%)	Na_2CO_3 (%)	P_2O_5 (%)	Sübye Kemiği (%)	Yumurta Kabuğu (%)	Lületaşı Tozu (%)	Ph	Jel Oluşumu	Sinterleme (1250°Cde2,5 saat)
N-H30S40	30	5	10	5	10	40	-	-	7,50	BAŞARILI	BAŞARILI
N-H30S30	30	10	10	10	10	30	-	-	7,33	BAŞARILI	BAŞARILI
N-H30S20	30	10	15	10	15	20	-	-	6,68	BAŞARILI	BAŞARILI
M-H30S40	30	5	10	5	10	40	-	-	5,77	BAŞARILI	BAŞARILI
M-H30S30	30	10	10	10	10	30	-	-	6,86	BAŞARILI	BAŞARILI
M-H30S20	30	10	15	10	15	20	-	-	6,71	BAŞARILI	BAŞARILI
N-H30L40	30	5	10	5	10	-	-	40	7,46	BAŞARILI	BAŞARILI
N-H30L30	30	10	10	10	10	-	-	30	7,24	BAŞARILI	BAŞARILI
N-H30L20	30	10	15	10	15	-	-	20	7,41	BAŞARILI	BAŞARILI
M-H30L40	30	5	10	5	10	-	-	40	7,62	BAŞARILI	BAŞARILI
M-H30L30	30	10	10	10	10	-	-	30	7,50	BAŞARILI	BAŞARILI
M-H30L20	30	10	15	10	15	-	-	20	7,55	BAŞARILI	BAŞARILI
N-H30Y40	30	5	10	5	10	-	40	-	7,50	BAŞARILI	BAŞARILI
N-H30Y30	30	10	10	10	10	-	30	-	7,30	BAŞARILI	BAŞARILI
N-H30Y20	30	10	15	10	15	-	20	-	7,67	BAŞARILI	BAŞARILI
M-H30S40	30	5	10	5	10	-	40	-	7,50	BAŞARILI	BAŞARILI
M-H30S30	30	10	10	10	10	-	30	-	7,50	BAŞARILI	BAŞARILI
M-H30S20	30	10	15	10	15	-	20	-	7,53	BAŞARILI	BAŞARILI

* N- kodlu numuneler nano boyutta hidroksiapatit kullanıldığını göstermektedir,

* M- kodlu numunelerde mikron boyutta hidroksiapatit kullanıldığını göstermektedir,

* H kodu karışımda hidroksiapatit, S kodu sübye kemiği, L kodu lületaşı, Y kodu yumurta kabuğu olduğunu, bu kodların yanındaki rakamlar ise yüzde içeriklerini vermektedir.

HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı (III. grup) biyo-greftlerin üretimi için I ve II. grup'ta kullanılan sol-jel yöntemi tekrarlanmıştır. Alternatif biyo-greft üretimi için kullanılan başlangıç malzemeleri ve bunların kullanım oranları Tablo 3.6'da gösterilmiştir. HA esaslı kemik grefti üretimi sırasında nano ve mikron boyutta HA ve farklı oranlarda sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu kullanılarak bu farklı oranların biyo-greftlerin morfolojik, fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tablo 3.5'de gösterilen %30 oranında nano ve mikron boyuttaki HA, sabit oranlardaki CaO, P_2O_5, KH_2PO_4 ve Na_2CO_3 katkı malzemeleri ve %20-40 oranında sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu ile Ca/P oranı 1,67

olacak şekilde distile su ve etanol ile çözündürüldükten sonra 800 rpm hızda 15 dak. magnetik olarak karıştırılmıştır. Daha sonra homojen bir jel yapısı elde edebilmek için P_2O_5 bileşiği başka bir beherde distile su ile çözündürülüp mağnette karıştırılan karışıma eklendikten sonra 37°C'de 30 dak. % 35 Amplitude şiddetinde homojenizerde karıştırılmıştır. Üretilen greftlerin pH değeri 5,0-6,5 arasında değiştiği için greftlerin jel yapısı değiştirilmeden NH_4OH bileşiği kullanılarak pH değerleri Tablo 3.6.'daki değerlere getirilmiştir.

Bütün HA esaslı kemik greftleri normal atmosferde 3 saat yaşlandırılıp, 120°C de 24 saat kül fırınında kurutulduktan sonra mekanik testler için 3 kN/s hızla 24 N yük altında 15 mm çap ve 10 mm yükseklikte silindir şeklinde tek yönlü izostatik preslenmiş ve 1180ºC de 2,5 saat vakum atmosferinde sinterlenmiştir.

3.3.4. Poroz Yapıda (HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Tozu Esaslı) Biyo-Greftlerin Üretilmesi (IV. Grup)

İnsan kemiği kortikal ve trabeküler kemikten oluşmakta olup, trabeküler kemik %50-90'ı poroz yapıya sahip ve kortikal kemiğin etrafını sarmaktadır [60,61]. Kemiğin bu özellikleri göz önüne alınarak greft üretilirken, kullanılan tozların şekli, boyutu, miktarı, üretim yöntemi, sinterleme sıcaklığı gibi özelliklerin tümüne dikkat edilerek, kemiğin kimyasal ve fiziksel yapısına benzer yapı elde edilmeye çalışılmıştır. Bunun için, %10-40 oranlarında sübye kemiği, lületaşı, hidroksiapatit, biyocam esaslı ve %20-75 jelatin yardımıyla alternatif biyo-greftler üretilmiştir. Bunun için sübye kemiği, lületaşı, hidroksiapatit ve biyocam dışında sinterlenebilirliği arttırmak için KH_2PO_4 ve Na_2CO_3, jelleşmeyi ve kısmende sinterlenebilirliği arttırmak için P_20_5, biyouyumluluğu arttırmak için $AgNO_3$ ve mekanik özellikleri arttırmak için de Zr ve Y_2O_3 katkı malzemeleri kullanılarak test edilmiştir. Sol-jel yöntemiyle üretim sonrası biyo-greftler kademeli olarak kurutulmuştur. Bunun için 120°C sıcaklıkta yapısındaki nemin bir kısmı uzaklaştırılırken, sinterleme sırasında uzaklaştırılması gereken jelatin tam olarak uçmadığı ve fırın vakumu yetersiz kaldığı için sinterleme öncesi 350°C sıcaklıkta hem yapıda kalan nem hemde jelatinin bir kısmı uzaklaştırılmıştır.

Tablo 3.7. Poroz yapıya sahip alternatif biyo-greftlerde kullanılan kimyasal bileşikler, oranları ve pH değerleri

Biyo-greft Kodları	HA (%)	KH_2PO_4 (%)	Na_2CO_3 (%)	P_2O_5 (%)	Jelatin (%)	CaO (%)	$AgNO_3$ (%)	Zr (%)	Yttria (%)	Lületaşı (%)	Sübye Kemiği (%)	Biyocam (%)	pH
H40ZrYt	40	10	10	10	-	5	5	10	10	-	-	-	8,10
H30G20	30	10	10	10	20	10	10	-	-	-	-	-	7,67
H30G30	30	10	5	10	30	5	10	-	-	-	-	-	8,11
H30G40	30	5	5	5	40	5	10	-	-	-	-	-	8.77
H10G75	10	2,5	2,5	2,5	75	2,5	5	-	-	-	-	-	7,65
S30G20	-	10	5	10	20	-	5	10	10	-	30	-	7,3
S30G30	-	5	5	5	30	-	5	10	10	-	30	-	8,34
S30G40	-	5	5	5	40	-	5	5	5	-	30	-	8,34
S13G75	-	2	2	2	75	-	2	2	2	-	13	-	7,73
L40G20	-	10	10	10	20	-	10	-	-	40	-	-	8.00
L40G30	-	5	5	10	30	-	10	-	-	40	-	-	7,6
L40G40	-	5	5	5	40	-	5	-	-	40	-	-	8.00
L10G75	-	2,5	2,5	5	75	-	5	-	-	10	-	-	7,6
B40G20	-	10	5	10	20	-	5	10	-	-	-	40	7,31
B20G50	-	5	5	5	50	-	5	10	-	-	-	20	7,12
B10G75	-	2,5	2,5	2,5	75	-	2,5	10	-	-	-	20	7,19
B40G20	-	10	5	10	20	-	5	10	-	-	-	40	7,31
B20G50	-	5	5	5	50	-	5	10	-	-	-	20	7,12
B10G75	-	2,5	2,5	2,5	75	-	2,5	10	-	-	-	20	7,19
B40G20	-	10	5	10	20	-	5	10	-	-	-	40	7,31
B20G50	-	5	5	5	50	-	5	10	-	-	-	20	7,12
B10G75	-	2,5	2,5	2,5	75	-	2,5	10	-	-	-	20	7,19

Tablo 3.7'de poroz yapıda üretilen biyo-greftler de kullanılan kimyasal bileşikler, % ağırlık miktarları ve pH değerleri verilmektedir. Tabloda belirtilen % oranlara sahip kimyasal bileşiklerdeki greftler sol-jel yöntemiyle karıştırılarak IV. grup üretilmiştir. Bunun için bütün bileşikler etanol ve distile su ile 30 dakika oda sıcaklığında normal atmosferde magnetik karıştırıcıda karıştırılmış ve jel yapısı elde edilmiştir. Daha sonra 30 dakika 37°C de %35 Amp şiddetinde homojenizerde karıştırılarak homojen ve jel yapı elde edilmiştir. SEM-EDX görüntülerinden porların şekli ve miktarını belirleyebilmek için greftler jel halinden silindir kalıplara dökülerek oda sıcaklığında 5 saat yaşlandırılmıştır. Yaşlandırma sonrası greftler kademeli olarak kurutulmuştur. Bunun için kül fırınlarında önce 120°C de 24 saat normal atmosferde

ısıtılarak yapısındaki nem uzaklaştırılmış ve daha sonra 350°C de 2 saat kurutma işlemi yapılıp jelatin ısı etkisiyle uzaklaştırılarak (uçurularak) boşluklar (porlar) oluşturulmuştur. En son işlem olarak da 1200°C de 2,5 saat vakum atmosferinde sinterleme işlemi yapılmıştır.

3.4. Malzeme Karekterizasyonu

Değişik kompozisyonlarda üretilen ve değişik koşullarda sinterlenen malzemelerin özelliklerini belirlemek için alternatif biyo-greftler üzerinde sinterleme sonrasında faz yapıları ve sinterlenebilirlik açısından karakterize edilmişlerdir. Bunun için SEM-EDX, XRD ve FTIR cihazları kullanılmıştır.

3.4.1. SEM-EDX Analizi

HA, biyocam, lületaşı, sübye kemiği ve yumurta kabuğu esaslı alternatif biyo-greftlerin morfolojilerini incelemek amacıyla JEOL, Model JSM-7001F marka SEM-EDX cihazları kullanılmıştır.

3.4.2. XRD Analizi

Üretilen alternatif biyo-greftlerin toz X-ışını kırınım desenleri, BRUKER D8 ADVANCE (λ=1,5406Å) marka diffraktometre kullanılarak kaydedildi. Diyagramlar, 2q=3-70° aralığında, 2°/dk tarama hızında ve 1s sabit zaman aralığında kaydedildi.

3.4.3. FTIR Analizi

Sentezlenen örneklerin yapılarını belirlemek için FTIR (ALTI Unicam WATTSON 1000) analizi yapılmıştır. FTIR analizlerinde 4000 – 400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında çalışan Fourier dönüşümlü infrared spekroskopisi kullanılmıştır.

3.5. Biyomekanik Testler

Biyomekanik çalışmalarında, mühendislik yöntemleri de kullanılarak, canlıların nasıl hareket ettikleri, hareketlerinin nasıl kontrol edildiği ve hareket sırasında değişik bölümlerde oluşan kuvvet sisteminin etkisi incelenmekte olup canlı ve cansız dokular üzerinde zorlanma durumları incelenmekte ve tedavi yöntemleri test edilmekte ve geliştirilmektedir. Ürettiğimiz greftler uzun kemiklerin kırık bölgelerini doldurmak için kullanılmakta olup, basma kuvvetine maruz kaldığı için basma deneyi yapılmıştır. Ayrıca in vivo deneyi sırasında kare şeklinde açılan 3.2 mm uzunluğundaki defekt bölgesine in vivo deneyi sonrası eğme testi uygulanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda, kemik kırıkları onarımı için ürettiğimiz ürünler Shimadzu (5kN) marka çekme-

basma cihazında basma ve eğme testlerine tabi tutulmuştur. Basma deneyleri için numuneler 10 mm çapında ve 75 mm yüksekliğinde silindirik şekilde üretilmiştir. Bütün greftlere 5 N/mm^2 ön yükleme yapıldıktan sonra, I ve III. gruplar arasındaki biyo-greftlere 5mm/dak hızda, IV. grup biyo-greftlere ise 2 mm/dak hızda basma uygulanarak test edilmiştir. Eğme testleri ise 5mm/dak hızda uygulanmıştır.

3.6. İn Vivo Deneyler

Kemik greftleri uygulaması, iyi huylu kemik tümörlerinde ve kırıklarda dolgu malzemesi olarak kullanılan standart cerrahi işlemlerden biridir. Bu tür deformasyonların yeniden yapılandırma işlemlerinde; insan, hayvan kaynaklı ve biyolojik esaslı olmayan malzemeler kullanılır. Bu uygulamada kullanılacak malzemenin, kolay üretilip elde edilebilen, mekanik özellikleri ve biyouyumluluğu yüksek bir malzeme olması gereklidir. Bu amaçlar doğrultusunda ürettiğimiz alternatif biyo-greftlerin biyouyumluluğunu incelemek amacıyla yapılan in vivo operasyonları Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 24.03.2010-2010/7-29 sayılı onay alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın materyalini ortalama 6.2 aylık (dağılım 5-8 ay) ortalama ağırlıkları 3240 gr (min 2900- max 3400 gr) olan 24 adet Yeni Zelanda tavşanı oluşturmuştur.

3.6.1. ICP-MS Analizleri

Yeni Zelenda tavşanları üzerinde yaptığımız in vivo çalışmasında, açılan kemik defektlerine üretilen alternatif biyo-greftler doldurulmuştur. Takip süresi iki ay olan in vivo deneyleri sonunda kimyasal malzeme miktarında değişme olup olmadığını incelemek amacıyla ICP-MS analizi yapılmıştır. Bunun için Mersin Üniversitesi Jeoloji Mühendisliği Bölümünde AGILENT 7500ce marka ICP-MS cihazı kullanılmıştır.

3.7. İn Vitro Deneyler

Üretilen biyo-greftlerin canlı vücut dışında (laboratuar ortamında) toksik özelliklerini incelemek amacıyla in vitro deneyleri yapılmıştır. Bunun için üretilen HA, lületaşı, yumurta kabuğu ve sübye kemiği esaslı alternatif biyo-greftlerin osteoblast ve L929 hücreleriyle in vitro deneyleri yapılarak hasarlı bölgeyi tedavi etmeye yarayan canlı hücrelerin çoğalıp çoğalmadığı incelenerek toksik etkisi araştırılmıştır.

3.7.1. Sitotoksisite Deneyleri

Üretilen alternatif biyo-greftlerin toksik etkisini incelemek amacıyla sitotoksisite analizleri Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarlarında yapılmıştır. Bunun için üretilen alternatif biyo-greftler çözündürülüp, karışımın konsantrasyonunu 1mg/ml'e düşürmek amacıyla DMEM çözeltisi ilave edilerek seyreltilmiştir.

Sitotoksite testlerinde de osteoblast ve L929 fare (rat) fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin toksisite değerlendirmesi MTS (hücre proliferasyonu testi) (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil) tetrazolium, (CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay) testi ile 96 kuyucuklu kültür kaplarında yapılmıştır. Öncelikle hücreler, her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde 100 µl kültür ortamı içerisinde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilip 24 saat büyümeye bırakılmıştır. Ertesi gün, bu kültür ortamı çekilmiş ve üzerine hücrelerle muamele edilmek istenen konsantrasyonlar kültür ortamı(DMEM) içindeki hücrelere eklenmiştir. Negatif kontrol olarak kültür ortamı(DMEM) ve pozitif kontrol olarak ise %20 DMSO kullanılmıştır. İnkübasyon süreleri bittiğinde kuyucuklardaki kültür ortamı çekilip ve 10 µl MTS+100 µl kültür ortamı olacak şekilde bu kuyucuklara eklenmiştir. MTS ile maruz bırakılan hücreler 2-3 saat %5 CO_2'de 37ºC'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında hücre canlılığı 490 nm'de otomatik petri okuyucu (Elisa pleyt okuyucusu) ile ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda (0,1-0,5µm/ml) ve 24-72 saat aralıklarında kuyucuklardaki hücreler ölçülerek greftlerin toksik özelliği incelenmiştir.

3.8. Üretilen Biyo-Greftlerin Porozite (%) Ölçümleri

Poroz yapıdaki (HA, biyocam, sübye kemiği ve lületaşı esaslı) biyo-greftlerin (IV. grup) %porozite ölçümleri Arşimet'in ağırlık ve suyun yer değiştirme prensibine dayalı bir sistem ile yapılmıştır. Bunun için aşağıda verilen formüller kullanılmıştır. Birinci aşamada, boş bir piknometrenin ağırlığı hassas terazi ile tartılmıştır (W1). İkinci aşamada, sol-jel yöntemiyle üretilen biyo-greftler toz halindeyken daha önce ölçüsü alınan piknometre içine doldurularak ağırlığı ölçülmüştür (W2). Üçüncü aşamada, biyo-greft tozuyla doldurulan piknometre su ile doldurulup (W3) ağırlığı hesaplanmıştır. Dördüncü aşamada, birinci aşamada ağırlığı ölçülen boş piknometre su ile doldurularak (W4) tartılmıştır. Bu hesaplamalar doğrultusunda toz şeklindeki biyo-greftin aşağıda verilen teorik yoğunluğu hesaplaması ($\tilde{n}_{teo}$) yapılmıştır. Bunun yanında silindir şeklinde üretilen biyo-greftlerin ağırlığının (W), hacmine (V) oranı hesaplanarak silindir şeklindeki biyo-greftlerin deneysel yoğunluğu($\tilde{n}_{den}$) hesaplanmıştır. Toz şeklindeki biyo-greft ile silindir şekilde üretilen biyo-greftlerin yoğunluk hesaplamalarından sonra aşağıda verilen %porozite (%P) formülüyle porozite miktarı ölçülmüştür.

$$\tilde{n}_{teo} = (W2-W1)/ [(W2-W1)- (W3-W4)] \quad (3.1)$$

$$\tilde{n}_{den} = W/V \quad (3.2)$$

$$\%P = [(\tilde{n}_{teo} - \tilde{n}_{den})/ \tilde{n}_{teo}] *100 \quad (3.3)$$

4. SONUÇLAR

Günümüzde insan yaşamını kolaylaştırmak, hastalıkların ve kemik deformitelerinin tedavisini hızlandıracak ve tekrar ettirmeyecek operasyonlarla yapabilmek amacıyla tıpda, özellikle de ortopedi alanında gerekli implant ve alternatif malzemeler ile ilgili araştırma çalışmaları giderek artan yoğunlukta devam etmektedir. Her geçen gün, vücut ve dokularla daha uyumlu, vücut ortamında daha uzun süre dayanabilen, daha ekonomik ve daha estetik görünüm taşıyan biyomalzemelerin ortaya çıkarılması ve kullanımı artmaktadır. Toz metalurjisi, tane boyutu kontrolü ile mekanik özelliklerin kontrol edilebilmesi ve çoğu zaman döküm malzemelerinden daha iyi mekanik özellikler elde edilebilmesi, gözenekliliğin kontrol edilebilmesi, yüksek ergime sıcaklığına sahip malzemelerin ergime sıcaklıklarının altında üretme imkanı sunması ve yoğunluk farkı nedeniyle döküm yoluyla alaşımları elde edilemeyen malzemelerin bu yöntemle alaşımlarının elde edilebilmesi gibi avantajlarla öne çıkan bir prosestir.

Sol-jel teknolojisi, çözelti formundan yola çıkılarak farklı uygulama alanlarına yönelik olarak seramik, cam ve kompozit malzemeler üretimine imkan veren bir metoddur [17, 18, 21-23]. Metal alkolsit çözeltileri veya metal tuzları, nitratlar, hidroksitler ve oksitler gibi inorganik bileşikler belirli oranlarda su ve alkolle birleştirilip bir solüsyon elde edilir[17, 18, 21-23]. Bu solüsyonun belirli konsantrasyon ve sıcaklıklarda karıştırılması neticesinde solüsyon içerisinde birbirini izleyen bir dizi kimyasal reaksiyon ve taneciklerin sahip olduğu yüklerinin elektrokimyasal etkileşimleri ile bir ağ meydana gelmektedir (jelleşme). Bu ağ gitgide büyüyüp sistem içerisindeki bütün noktalara ulaşarak kolloidal bir yapı meydana getirmektedir. Deneylerimizde kullandığımız sol-jel üretim yöntemi kimyasal yönünün kontrol edilebilir olması, hammaddelere kıyasla daha iyi homojenlik sağlaması, üretim için düşük sıcaklıkların kullanılması, kompleks şekilde yeni malzemeler ve özellikler elde edilmesi gibi avantajlara sahiptir.

Yaptığımız bu detaylı deneysel çalışmalarda 4 farklı biyo-greft grubu üretilerek analizleri yapılmıştır.

I. grupta $Ca(OH)_2$ ve fosforik asit kullanılarak hidroksiapatit sentezi yapılmıştır.

II. grupta nano boyutta HA esaslı ve CaO, P_2O_5, KH_2PO_4 ve Na_2CO_3 katkılı biyo-greftler üretilmiştir.

III. grupta nano ve mikron boyutta HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu gibi katkı ürünleri içeren biyo-greftler sol-jel yöntemiyle sentezlenmiştir.

IV. grupta HA, biyocam, lületaşı ve sübye kemiği esaslı alternatif biyo-greftlere polimer (jelatin) ilave edilerek poroz yapı elde edilmeye çalışılmıştır.

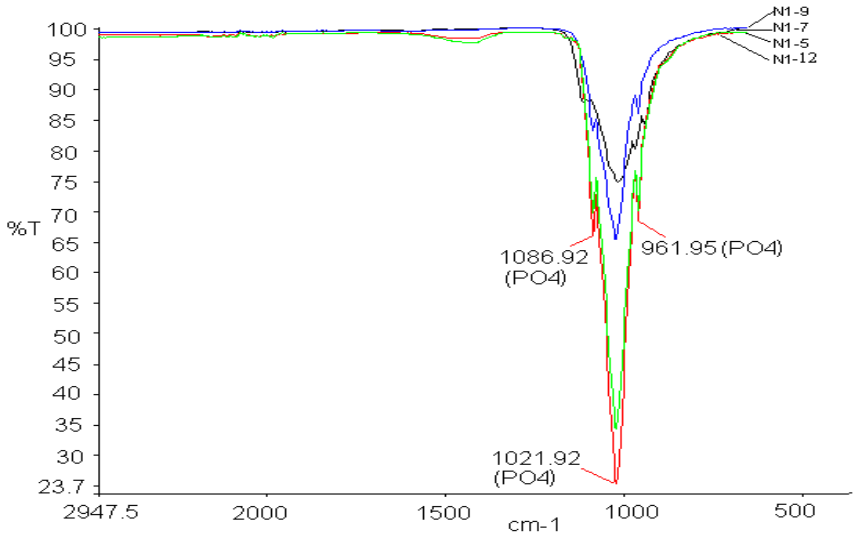
Sonuçta; I ve II. gruptaki biyo-greftler ile in vivo ve I-III. gruplar arası alternatif biyo-greftlerle de in vitro deneyi yapılmıştır. Ayrıca bütün biyo-greftlere SEM, XRD, FTIR analizleri yapılarak ilave edilen kimyasal bileşiklerin, kemik greftlerinin, üretim yönteminin ve sinterleme sıcaklığının numuneler üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1. FTIR

Ürettiğimiz alternatif biyo-greftlerin kimyasal yapılarının belirlenmesi amacıyla FTIR analizleri yapılmıştır. Analizler toz halindeki örnekler üzerinde yapılmıştır. Bu yöntemle HA, biyocam, lületaşı, yumurta kabuğu ve sübye kemiği esaslı biyo-greft üretimi esnasında ilave edilen CaO, P_2O_5, Na_2CO_3 ve KH_2PO_4 kütleleri değiştirilerek (Ca/P oranı 1,67'de sabit kalmak koşuluyla) bu değişimin numunelerde oluşan kimyasal bağlar üzerine etkileri gözlemlenmiştir. Ayrıca $Ca(OH)_2$ ile fosforik asit bileşiklerini kullanarak yapılan HA sentezindeki kimyasal değişim incelenmiştir. HA elde etmek için sentezlenen örneklerin FTIR spektrumları incelendiğinde HA oluşumuna bağlı PO_4^{-3} bileşiklerinin oluştuğu gözlenirken, bazı lületaşı, yumurta kabuğu ve sübye kemiği içerikli biyo-greftler de CO_3^{-2} bileşiklerinin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.-Şekil 4.2.).

4.1.1. I. Grup Biyo-Greftlerin FTIR Sonuçları

Bu yöntemle HA sentezi esnasında kullanılan $Ca(OH)_2$ ve fosforik asit bileşiklerinin (Ca/P oranı 1,67'de sabit kalmak koşuluyla) HA oluşumuna etkisi incelenmiştir. Bu maddelerin karışımı sonucu HA sentezi gerçekleşmiştir. Şekil 4.1'de gösterilen sentez örneklerinden elde edilen FTIR spektrumları incelendiğinde HA oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir.

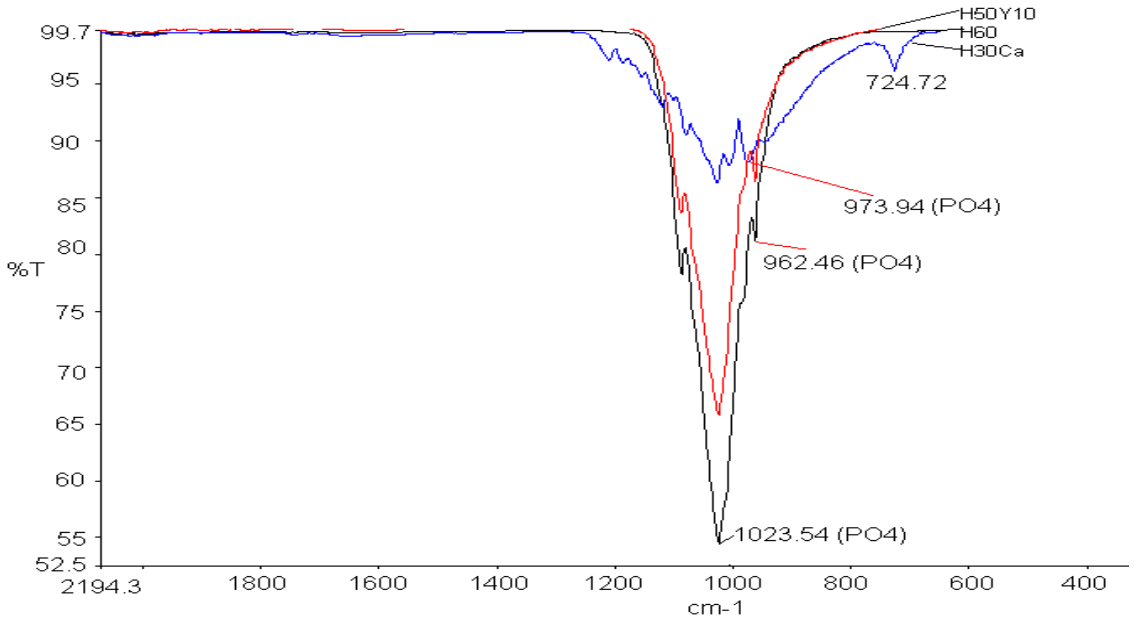


Şekil 4.1. Farklı pH değerlerine sahip HA sentez-numunelerinin [N1-5 (pH=5), N1-7 (pH=7), N1-9 (pH=9) ve N1-12 (pH=12)] FTIR spektrumları

Şekil 4.1'de farklı pH değerlerine sahip hidroksiapatit sentez numunelerinin kimyasal değişimlerini incelemek amacıyla yapılan FTIR analizi sonuçları verilmektedir. Farklı pH değerlerine sahip bütün HA sentez numuneleri kalsiyum fosfata bağlı karakteristik bantlarla gösterilmektedir. Bütün HA sentez numuneleri, 1087-970 cm^{-1} arasındaki titreşime bağlı olarak karakteristik PO_4^{-3} piklerini vermektedir. pH farkının HA sentez numuneleri üzerine etkileri kıyaslandığında ise, benzer pik şiddetlerinde PO_4^{-3} bileşiği görülürken, en keskin pikin pH değeri değiştirilmeyen N1-12 kodlu biyo-greftten elde edildiği gözlenmektedir. NH_4OH ile pH değeri değiştirilen N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu biyo-greftlerde ise pH değeri arttıkça piklerin şiddetinin düştüğü görülmektedir.

4.1.2. II. Grup Biyo-Greftlerin FTIR Sonuçları

Doğal HA'de Mg^{2+}, F^-, CO_3^{2-} gibi pek çok sayıda iyon yer almaktadır [201]. Bu yüzden HA'e pek çok değişik element eklenerek çeşitli araştırmalar yapılabilmektedir [37-39]. İç yapı, mekanik özellikler, biyouyumluluk ve biyoaktivite özellikleri yönünden çok daha faydalı ürünler geliştirebilmek için farklı iyonlar saf HA'in iç yapısına eklenebilir. Bu amaç doğrultusunda, HA esaslı biyo-greftler üretilirken, CaO, P_2O_5, Na_2CO_3 ve KH_2PO_4 gibi kimyasal bileşikler ilave edilerek bu katkı malzemelerinin biyo-greftin iç yapı ve biyouyumluluğu üzerine etkileri incelenmiştir.

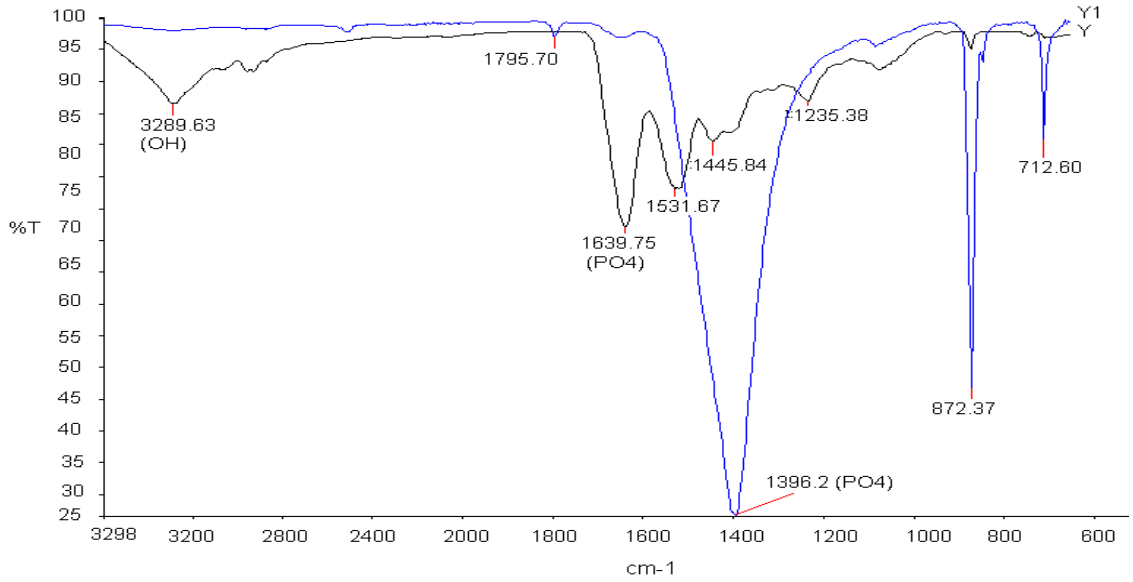


Şekil 4.2. H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR analiz spektrumları

Şekil 4.2'de farklı kimyasal bileşime sahip (PO_4^{-3}, CO_3^{-2}, OH^- gibi) kemik greftlerinin FTIR spektrası gösterilmektedir. FTIR spektrasına göre sol-jel yöntemiyle üretilen üç greftte benzer spektral sonuç elde edilmektedir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi 1180 °C de 2,5 saat sinterleme sonrası tozların FTIR spektrumu 1087-970 cm^{-1} arasındaki titreşime bağlı olarak karakteristik pikler göstermektedir. FTIR spektrası sonucunda CO_3^{-2} bileşikleri pik vermemektedir (Şekil 4.2). Fakat CO_3^{-2} bileşiği ile PO_4^{-3} bileşiğinin pikleri çakıştığı için ve PO_4-^{3} bileşiğinin dalga sayısı CO_3^{-2} ye göre fazla ve bandı geniş olduğu için CO_3^{-2} bileşiği gözlenmemektedir. Ayrıca H30Ca kodlu biyo-greft H60 ve H50Y10 kodlu biyo-greftlerden farklı pikler gösterdiği Şekil 4.2'de gözlenmektedir. H30Ca kodlu biyo-greftin FTIR spektrasında 1290, 1117, 1112, 724 cm^{-1} pikleri PO_4^{-3} bileşiğini verirken, 2025 ve 1647 cm^{-1} pikleride CO_3^{-2} bileşiğini vermektedir.

4.1.3. III. Grup (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) Biyo-Greftlerin FTIR Sonuçları

Yapılan deneysel çalışmada, kemik grefti elde etmek için hidroksiapatite farklı oranlarda $CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli doğal malzemeler (sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu gibi) ilave edilmiştir. Sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu Bölüm 3.1.3'de anlatıldığı şekilde yıkanıp temizlenmiş ve iki aşamada boyutları küçültülmüştür. 1. Aşamada, elle havanda kuru olarak dövülerek, 2. Aşamada, etanolle mekanik olarak seramik kaplarda öğütülerek boyutları küçültülmüştür. Mekanik öğütme öncesi ve sonrası FTIR analiz sonuçları alınarak mekanik öğütmenin bu tozların kimyasal bileşikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Şekil 4.3 ve Şekil 4.5 arasında sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğunun mekanik öğütme öncesi ve sonrası FTIR analiz sonuçları verilerek etonolle yapılan mekanik öğütmenin kimyasal özellikleri üzerindeki etkileri test edilmiştir. Bütün biyo-greftlerin FTIR analizleri karbonat ve fosfata bağlı karakteristik bantlarla gösterilmiştir. Ayrıca bütün numunelerin FTIR spektrumunda, 1087-970 cm^{-1} arasında titreşime bağlı olarak karakteristik pikler PO_4^{-3} ü gösterirken, 3500-3650 cm^{-1} aralığında OH^- pikini vermektedir.

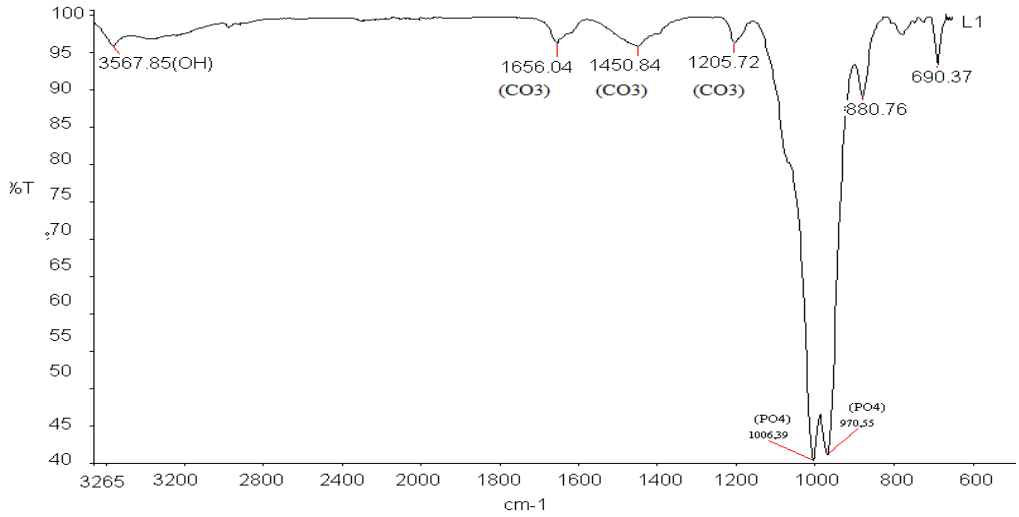


Şekil 4.3. Havanda ve mekanik öğütme sonrası yumurta kabuğu tozlarından alınan FTIR spektrumları.

*Y= El ile havanda öğütülmüş yumurta kabuğu

Y1= Havanda öğütüldükten sonra boyutlarını daha küçültmek için seramik kaplarda mekanik öğütülen yumurta kabuğu

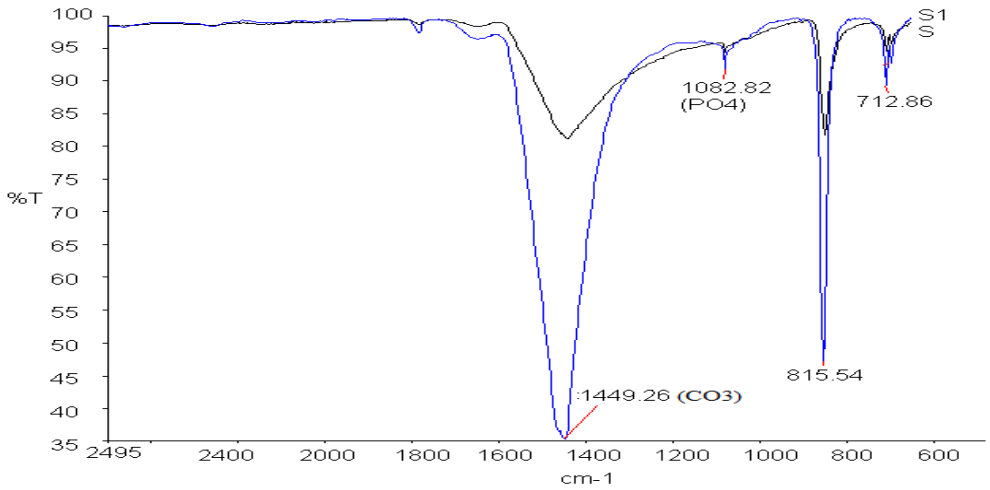
Havanda ve mekanik öğütme sonrası yumurta kabuğuna ait FTIR analiz sonuçları Şekil 4.3'de verilmektedir. Elle ve mekanik öğütme sonrası Y, Y1 kodlu numunelerde aynı bileşiklerin oluştuğu görülürken OH^- bileşiğinin piki sadece havanda ögütme sonrası, PO_4^{-3} bileşiğinin piki ise hem mekanik öğütme hemde havanda ögütme sonrası görülmüştür. Ayrıca etanol ile yapılan mekanik öğütme öncesi ve sonrası FTIR analizleri kıyaslandığında; mekanik öğütme sonrası piklerin şiddetinin arttığı ve pik şiddet değerlerinde sağa doğru kayma olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4. Havanda öğütme sonrası lületaşı tozlarından alınan FTIR spektrumları.

L1= Havanda öğütüldükten sonra boyutlarını daha küçültmek için seramik kaplarda mekanik öğütülen lületaşı

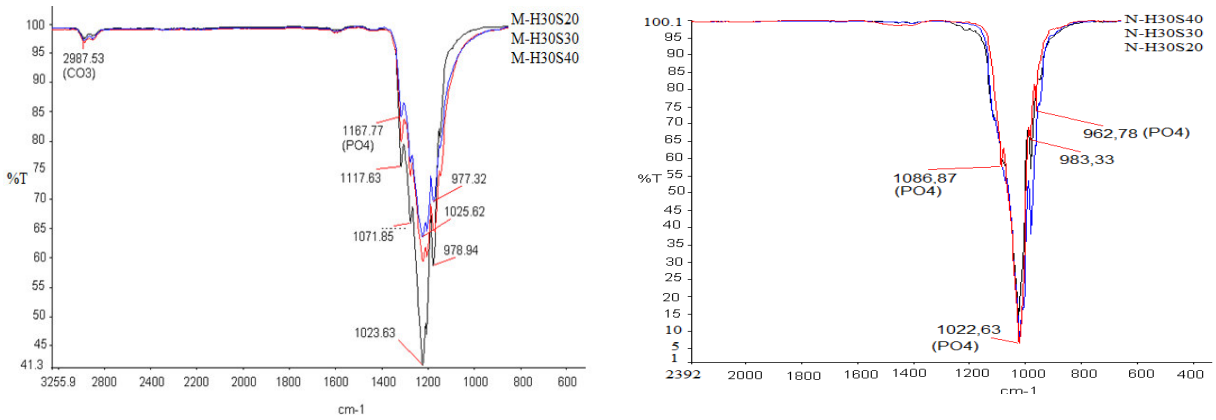
Afyon bölgesinden temin edilen ve katı kütle formunda (poroz olmayan) bulunan lületaşı alternatif biyo-greft üretiminde toz şeklinde kullanılması için öğütülmüştür. Bunun için lületaşı öncelikle kuru bir şekilde havanda öğütülüp toz haline getirilmiştir. Daha sonrada etanolle karıştırılıp seramik kaplarda mekanik olarak öğütülüp boyutları daha da küçültülmüştür. Arka arkaya yapılan bu öğütmelerin lületaşının kimyasal bileşimindeki etkisini incelemek amacıyla FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 4.4'de lületaşının mekanik öğütme öncesi FTIR analiz sonucu verilmiştir. Şekil 4.4'e göre 3567.85 cm^{-1} pikleri OH^- bileşiğini, 1656.04, 1450.84 ve 1205.72 cm^{-1} pikleri CO_3^{-2} ve 1006.39, 970.55 ve 880.76, 690.37 cm^{-1} pikleri de PO_4^{-3} bileşiğini göstermektedir.



Şekil 4.5. Havanda ve mekanik öğütme sonrası sübye kemiği tozlarından alınan FTIR spektrumları.
*S= Havanda öğütülmüş sübye,
S1= Havanda öğütüldükten sonra boyutlarını daha küçültmek için seramik kaplarda mekanik öğütülen sübye

Boyutları havanda ve mekanik öğütme ile küçültülen sübye kemiğinin karekterizasyon çalışmaları için FTIR spektrum tekniğinden faydalanılmıştır. Buna bağlı olarak, Şekil 4.5'de sübye kemiğinin mekanik öğütme öncesi ve sonrası FTIR analiz sonuçları verilmektedir. Spektrumda görüldüğü gibi havanda ve mekanik öğütme sonrası CO_3^{-2} bileşiğinin gerilim piki 1449.26 cm^{-1} de geniş bir bant olarak yer almaktadır. $Ca(PO_4)_2$ bileşiğine ait olan PO_4^{-3} bileşiğinin pikleri de 1082.82- 712.86 cm^{-1} şiddetlerinde görülmektedir.

HA esaslı alternatif biyo-greftler üzerinde sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu gibi katkı malzemelerinin etkilerini incelemek amacıyla üretilen biyo-greftlerin yapısal analizi için FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Bu nedenle öncelikle, sol-jel yöntemiyle HA esaslı ve %20-40 sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu içerikli biyo-greftler üretilmiştir. Bu ürünlerin dışında üretim sırasında jelleşmeyi, densifikasyonu ve sinterlemeyi arttırmak amacıyla KH_2PO_4, Na_2CO_3, P_2O_5, CaO gibi bileşiklerde kullanılmıştır. Sentezlenmiş olan bu biyo-greftlerin karakterizasyon çalışmalarında FTIR spekturum tekniklerinden faydalanılmıştır. Şekil 4.6 ve Şekil 4.8 arasında doğal malzemelerle (sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu) üretilen biyo-greftlerin FTIR spektrumları verilmektedir.

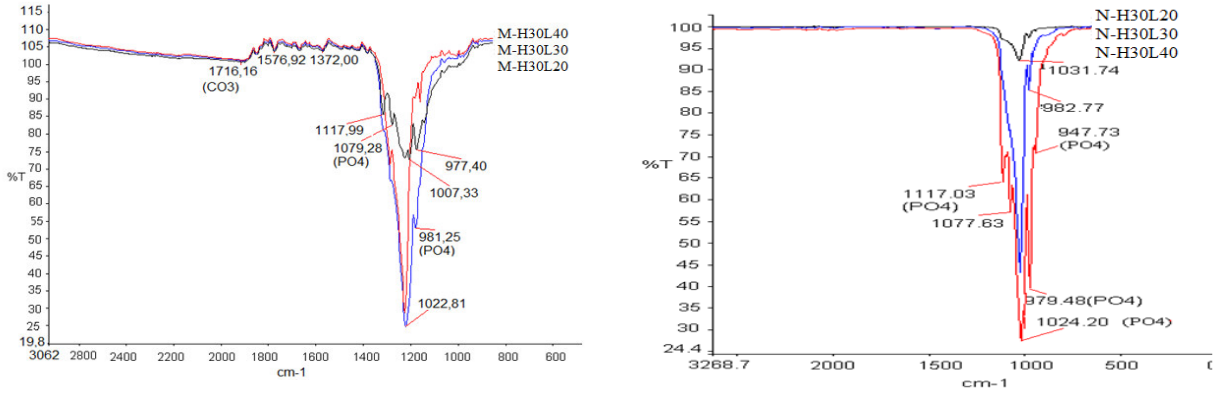


(a) (b)

Şekil 4.6. Mikron (a) ve nano (b) boyutta HA esaslı ve sübye kemiği katkılı alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları.

%20, 30, 40 oranlarında $CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli sübye kemiği ile %30 oranında HA esaslı biyo-greftlerin karakterizasyon çalışmalarında FTIR spektrum tekniklerinden faydalanılmıştır. FTIR analizleri ile biyo-greft üretiminde kullanılan mikron ve nano boyutta HA'in ve farklı oranlarda kullanılan sübye kemiğinin etkileri incelenmiştir. Şekil 4.6.(a)'da sübye kemiğiyle birlikte mikron boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerin FTIR sonuçları verilmektedir. Buna bağlı olarak mikron boyutta HA ve %20, 30 ve 40 oranlarında sübye kemiği kullanıldığın da, 2987.53 cm^{-1} de geniş ve şiddeti az $(CO_3)^{-2}$ piki görülmektedir. Ayrıca 1167.77-977.32 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ piki görülmekte olup, 1023.63 cm^{-1} de bu pik keskin bir şekilde yer almaktadır. %20-30 oranınkları arasında sübye kemiği ve nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerin FTIR sonuçları Şekil 4.6.(b)'de verilmektedir. FTIR sonuçlarına göre, 1086.87-962.78 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ pikleri görülmekte olup, bu piklerden 1022.63 cm^{-1} piki en keskin pik olarak gözlenmektedir.

Mikron ve nano boyutta HA esaslı biyo-greftler kıyaslandığında, nano boyutta HA içerikli biyo-greftlerde piklerin daha keskin ve dar olduğu görülmektedir. Ayrıca mikron boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde görülen $(CO_3)^{-2}$ pikinin nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde görülmediği gözlenmektedir. Farklı oranlarda sübye kemiği içeriği kıyaslandığında ise, mikron boyutta HA içerikli biyo-greftlerde sübye kemiği oranı arttıkça pik keskinliğinin arttığı ve en keskin piki %40 sübye kemiği içerikli biyo-grefttin verdiği görülmektedir. %20-40 oranlarında sübye kemiği ve nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde ise, tam tersi olduğu ve sübye kemiği oranı arttıkça pikin şiddetinin azaldığıda Şekil 4.6.(b)'de gözlenmektedir.



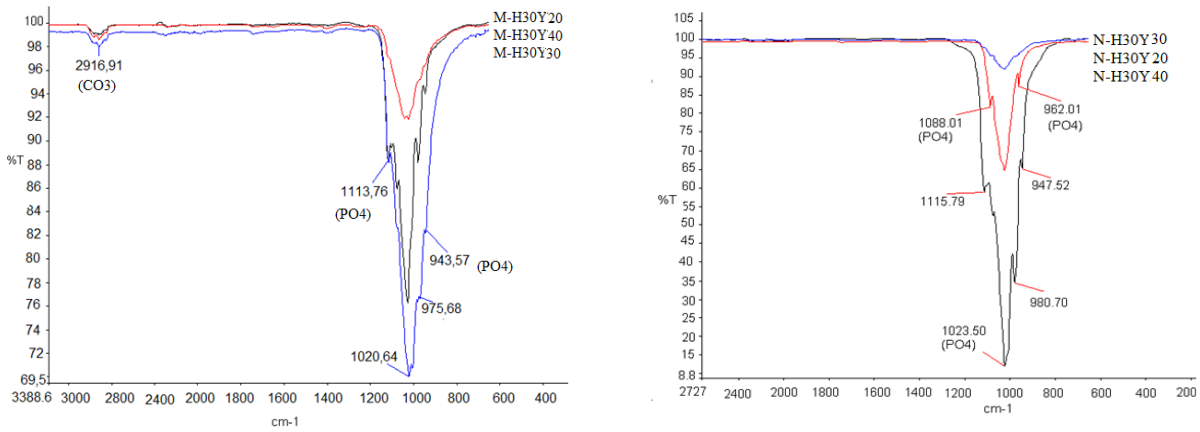
(a) (b)

Şekil 4.7. Mikron (a) ve nano (b) boyutta HA esaslı ve lületaşı katkılı alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları.

Şekil 4.7 %20-40 oranları arasında lületaşı içerikli ve mikron ve nano boyutta HA esaslı biyo-greftlerin FTIR sonuçlarını vermektedir. Şekil 4.7.(a)'da mikron boyutta HA esaslı ve farklı oranlarda lületaşı içerikli biyo-greftlerin FTIR sonuçları gösterilmektedir. Buna bağlı olarak, mikron boyutta HA ve %20-40 oranlarında sübye kemiği (cuttle fish) kullanıldığın da 1716.16-1372 cm^{-1} aralığında $(CO_3)^{-2}$ bileşiğine bağlı olarak geniş ve şiddeti az pikler yer almaktadır. Ayrıca 1117.99-977.40 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ piki görülmekte olup, 1022.81 cm^{-1} de bu pik keskin bir şekilde gözlenmektedir. Farklı oranlarda lületaşı içerikli biyo-greftler kıyaslandığında ise, mikron boyutta HA içerikli biyo-greftler de lületaşı oranı azaldıkça pikin keskinliğinin arttığı ve en keskin piki %20 lületaşı (sepiyolit) içerikli alternatif biyo-grefttin verdiği görülmektedir.

%20-30 oranlarında lületaşı ve nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerin FTIR sonuçları Şekil 4.7.(b)'de verilmektedir. Şekil 4.7.(b)'deki FTIR sonucuna göre, 1117.03-982.77 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ pikleri görülmekte olup bu piklerden 1024.20 cm^{-1} piki en keskin pik olarak yer almaktadır. Ayrıca lületaşı miktarı arttıkça pik şiddetinin arttığı Şekil 4.7.(b)'de görülmektedir.

Mikron ve nano boyutta HA'in kullanıldığı biyo-greftler kıyaslandığında, nano boyutta HA içerikli biyo-greftlerde piklerin daha keskin ve dar olduğu görülmekte olup, mikron boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde görülen $(CO_3)^{-2}$ piklerinin nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde olmadığı gözlenmektedir. Mikron ve nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde lületaşı miktarının etkileri karşılaştırıldığında, birbirlerinin tam tersi olduğu, mikron boyutta lületaşı kullanılarak üretilen biyo-greftlerde lületaşı miktarı arttıkça pikin şiddetinin arttığı görülürken, nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerin tersi olduğu ve pik şiddetinin azaldığı görülmektedir.



(a) (b)

Şekil 4.8. Mikron (a) ve nano (b) boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları.

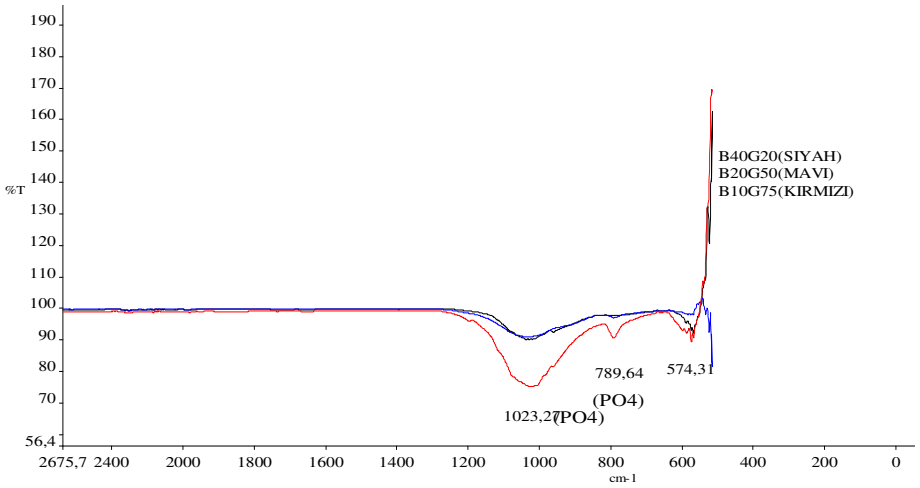
Molekülleri oluşturan atomlar sürekli bir hareket içinde olduklarından, molekülün öteleme hareketleri, bir eksen etrafında dönme hareketleri ve bir kimyasal bağın uzunluğunun periyodik olarak azalıp çoğalmasına veya moleküldeki açıların periyodik olarak değişmesine neden olan titreşim hareketleri doğar. Bu titreşim hareketlerine bağlı olarakta FTIR analizlerinde görülen pikler elde edilir. %20-40 oranlarında yumurta kabuğu ve %30 oranında HA kullanılarak üretilen alternatif biyo-greftlerin FTIR sonuçları Şekil 4.8.(a,b)'de verilmektedir. Şekil 4.8.(a)'da yumurta kabuğu ile birlikte mikron boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerin FTIR sonuçları verilmektedir. Buna bağlı olarak mikron boyutta HA ve %20-40 oranlarında yumurta kabuğu kullanıldığın da bütün biyo-greftlerde 2916.91cm^{-1} pik şiddetinde $(CO_3)^{-2}$ bileşiğine bağlı olarak geniş ve şiddeti az pikler yer almaktadır. Ayrıca 1113.76-943.57 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ piki görülmekte olup, 1020.64 cm^{-1} de bu pik keskin bir şekilde gözlenmektedir. %20-30 oranlarında yumurta kabuğu ve nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerin FTIR sonuçları Şekil 4.8.(b)'de verilmektedir. FTIR sonuçlarına göre, 1088.01-962.01 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ pikleri görülmekte olup, bu piklerden 1023.50 cm^{-1} piki en keskin pik olarak yer almaktadır.

Mikron ve nano boyutta HA esaslı biyo-greftler kıyaslandığında ise, nano boyutta HA içerikli biyo-greftlerde piklerin daha keskin ve dar olduğu, ayrıca mikron boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde görülen $(CO_3)^{-2}$ piklerinin nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde olmadığı görülmektedir. Ayrıca lületaşı ve sübye kemiği ilaveli biyo-greftler karşılaştırıldığında, farklı oranlarda yumurta kabuğu içerikli biyo-greftler de istikrarlı bir pik şiddeti dağılımı vermediği görülmektedir. Böylece lületaşı veya sübye kemiği miktarı arttıkça yada azaldıkça görülen pik şiddetindeki azalış veya artış, yumurta kabuğu ilaveli biyo-greftlerde

görülmemektedir. Yumurta kabuğu içerikli mikron boyutta HA esaslı biyo-greftlerde en yüksek pik şiddetini %30 yumurta kabuğu içerikli biyo-greft verirken, en düşük pik şiddetini de %20 yumurta kabuğu içerikli biyo-greft vermektedir. Nano boyutta HA içerikli biyo-greftlerde ise, en yüksek pik şiddeti %40 yumurta kabuğu içerikli biyo-greften elde edildiği görülürken, en düşük pik şiddetini de %30 yumurta kabuğu içerikli biyo-greftte gözlenmektedir.

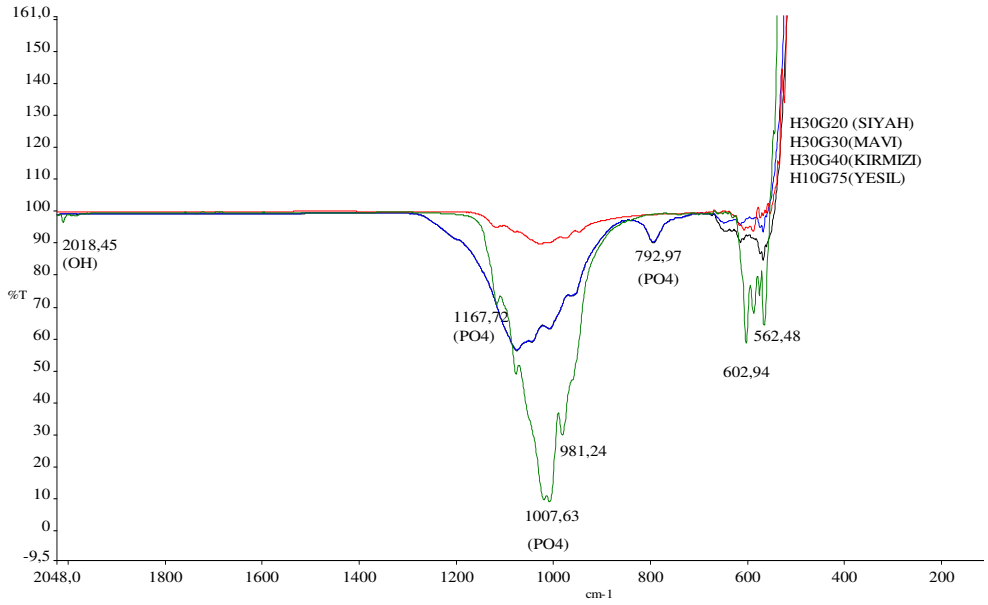
4.1.4. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Esaslı) Biyo-Greftlerin FTIR Sonuçları

Şekil 4.9 ve Şekil 4.12 arasında poroz yapıya ve farklı kimyasal bileşime sahip (PO_4^{-3}, CO_3^{-2}, OH^- gibi) kemik greftlerinin FTIR spektraları gösterilmektedir. FTIR spektralarına göre sol-jel yöntemiyle üretilen 12 tip biyo-greftte benzer spektral sonuçlar elde edilmiştir.



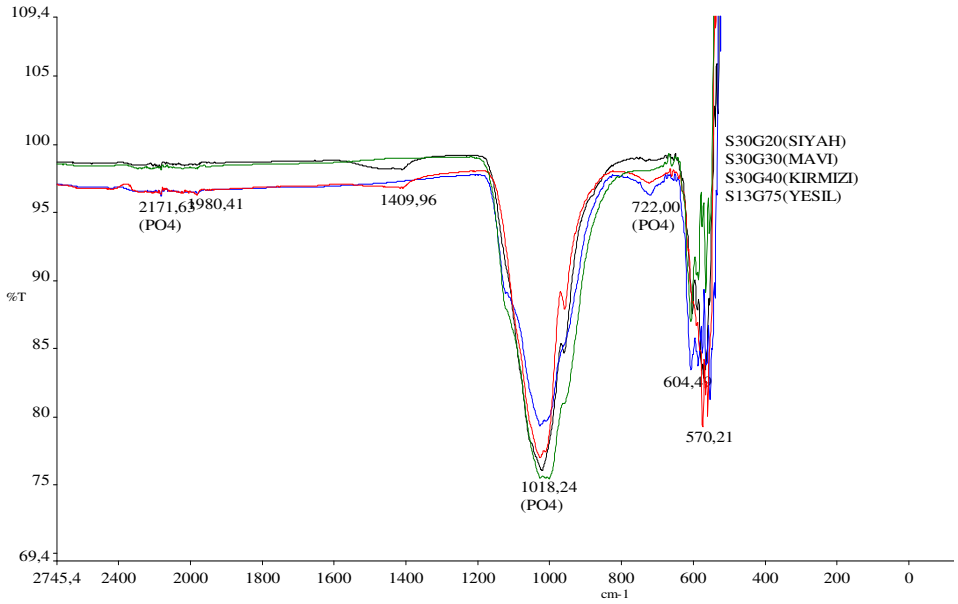
Şekil 4.9. B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları

Biyocam esaslı %20-75 jelatin içerikli B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları Şekil 4.9'da verilmektedir. Bütün biyo-greftler 1200-400 cm^{-1} şiddetleri arasındaki titreşime bağlı olarak karakteristik pikler göstermektedir. Bu pikler CO_3^{-2} ve PO_4^{-3} bileşiğine bağlı pikler olup, FTIR analizlerinde CO_3^{-2} bileşiği ile PO_4^{-3} bileşiğinin pikleri çakıştığı için ve PO_4^{-3} bileşiğinin dalga sayısı CO_3^{-2} ye göre fazla ve bandı geniş olduğu için CO_3^{-2} bileşiğine bağlı pikler görülmemektedir. Bunun yerine PO_4^{-3} bileşikleri 1023-570 cm^{-1} arasında pik vermektedir. 590-560 cm^{-1} arasında görülen yoğun ve keskin pikler ise yapıda bulunan metal bağlarını (M-O) göstermektedir. Sinterleme sonrası yapıda metale bağlı uzun bileşikler oluştuğu için pikler keskin değil daha yaygın bir görüntü vermektedir. Ayrıca bütün bileşikler aynı dalga boylarında aynı pikleri vermekte olup, jelatin miktarı arttıkça pikin şiddetinin arttığı da Şekil 4.9'da görülmektedir.



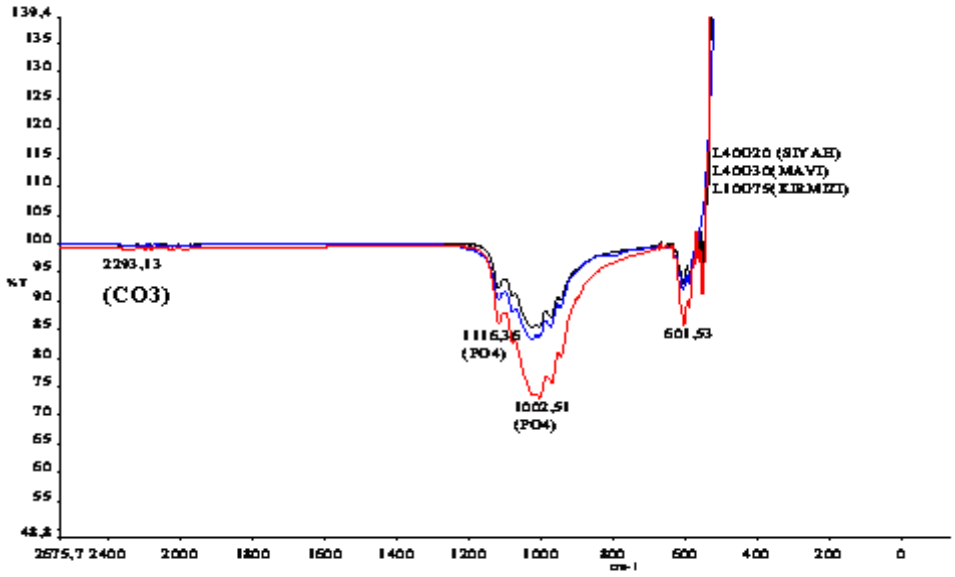
Şekil 4.10. H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları

Sol-jel yöntemiyle üretilen H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları Şekil 4.10'da gösterilmektedir. %10-30 oranlarında HA esaslı ve %20, 30, 40, 75 oranlarında jelatin içerikli bütün biyo-greftlerin FTIR analizleri kalsiyum hidroksite bağlı karakteristik bantlar verirken, içeriğindeki metal bileşiklerine bağlı olarak M-O bantlarınıda vermektedir. Şekil 4.10'da titreşime bağlı olarak karakteristik pikler 1167-792 cm^{-1} arasında PO_4^{-3}'ü gösterirken, 2018,85 cm^{-1} aralığında hidroksiapatite bağlı OH^- pikini ve 602-560 cm-1 arasında da M-O piklerini göstermektedir. Bütün bileşikler aynı bölgelerde benzer pikler gösterirken %jelatin miktarı arttıkça pik şiddetinin arttığıda Şekil 4.10'da gözlenmektedir. Ayrıca jelatin miktarı arttıkça pik şiddetinin artması sonucu H30G20, H30G30 ve H30G40 kodlu alternatif biyo-greftlerde görülmeyen OH^- pikinin %10 HA esaslı ve %75 jelatin katkılı (H10G75 kodlu) biyo-greft pikinde oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.11. S30G20, S30G30, S30G40 ve S13G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları

Şekil 4.11 %13-30 oranlarında sübye kemiği ve %20-75 oranları arasında jelatin içerikli S30G20, S30G30, S30G40 ve S13G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları verilmektedir. Buna bağlı olarak sübye kemiği ve jelatin kullanıldığın da bütün biyo-greftlerde benzer pikler görülürken, 2171,63-1409,96 cm^{-1} aralığında $(CO_3)^{-2}$ bileşiğine bağlı olarak geniş ve şiddeti az gerilim pikleri yer almaktadır. Ayrıca 1018,24-722 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ piki görülmekte olup, 1018,24 cm^{-1} de bu pikin en keskin pik olduğu gözlenmektedir. Farklı oranlarda sübye kemiği içeriği kıyaslandığında ise, sübye kemiği oranı arttıkça pikin keskinliğinin arttığı ve en keskin piki %75 sübye kemiği (cuttle fish) içerikli biyo-grefttin verdiği görülmektedir.



Şekil 4.12. L40G20, L40G30 ve L10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin FTIR spektrumları

Lületaşı ($CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli) esaslı ve %20-75 oranında jelatin içerikli alternatif biyo-greftlerin karakterizasyon çalışmalarında FTIR spektrum tekniklerinden faydalanılmıştır. Lületaşı esaslı biyo-greft üretimi sırasında, lületaşı ve jelatin kullanılarak hem lületaşının hemde jelatinin biyo-greftin kimyasal, fiziksel ve mekanik özelliklerine etkileri incelenmiştir. Şekil 4.12'de lületaşı esaslı ve jelatin içerikli biyo-greftlerin FTIR sonuçları verilmektedir. Buna baglı olarak Şekil 4.12'de bütün biyo-greftlerin 2293,13 cm^{-1} de $(CO_3)^{-2}$ bileşiğine bağlı geniş ve şiddeti az gerilim piki verdiği gözlenmektedir. Ayrıca 1116,36-601,53 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ piki görülmekte olup, en keskin pikin 1116,36 cm^{-1} şiddetinde elde edildiği belirlenmektedir. Lületaşı esaslı ve farklı oranlarda jelatin içerikli biyo-greftler kıyaslandığında, jelatin miktarı arttıkça pik şiddetinin ve genişliğinin arttığı ve L10G75 kodlu biyo-grefttin en yüksek ve en geniş pik şiddetine sahip olduğu Şekil 4.12'de görülmektedir.

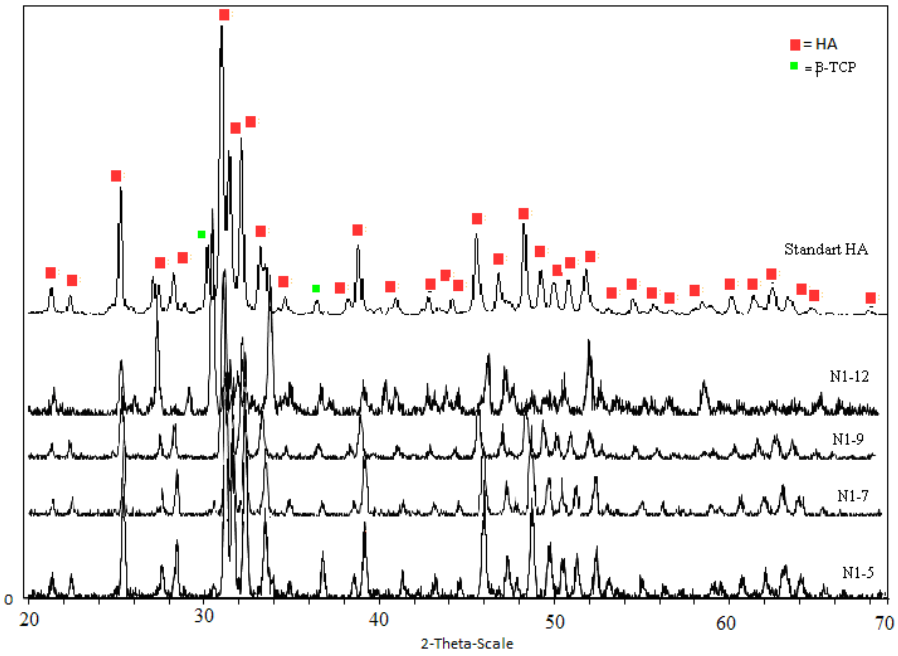
4.2. XRD Analizleri

Sentezlenen örneklerin kimyasal yapıları BRUKER D8 ADVANCE marka XRD cihazı ile analiz edilmiştir. Sol-jel yöntemiyle HA sentezi ve HA esaslı alternatif biyo-greft üretimi sonucu yapıda HA gibi kalsiyum fosfat içerikli bileşiklerin oluştuğu görülmüştür.

4.2.1. I. Grup Biyo-Greftlerin XRD Sonuçları

$Ca(OH)_2$ ve fosforik asit kullanılarak sol-jel yöntemiyle HA sentezi yapıldıktan sonra, pH değeri 12 olarak ölçülmüştür. Daha sonra, üretilen HA üzerinde pH farkının etkilerini incelemek

amacıyla, sentezin jel yapısı bozulmadan pH değeri NH_4OH kullanılarak sırasıyla 5, 7 ve 9 yapılmıştır. Ayrıca farklı değerlerde pH elde edilen numuneler 120ºC'de 24 saat kurutulmuş ve 1180ºC'de 2,5 saat vakum atmosferinde sinterlenmiştir. Farklı pH değerlerine sahip toz halindeki sentez malzemesinden HA üretilip üretilmediğine ve pH farkının üretilen sentez malzemesinin bileşik içeriğinde değişiklik oluşturup oluşturmadığını incelemek amacıyla XRD analizi yapılmış ve analiz sonuçları standart HA ile karşılaştırılarak Şekil 4.13'de verilmiştir.



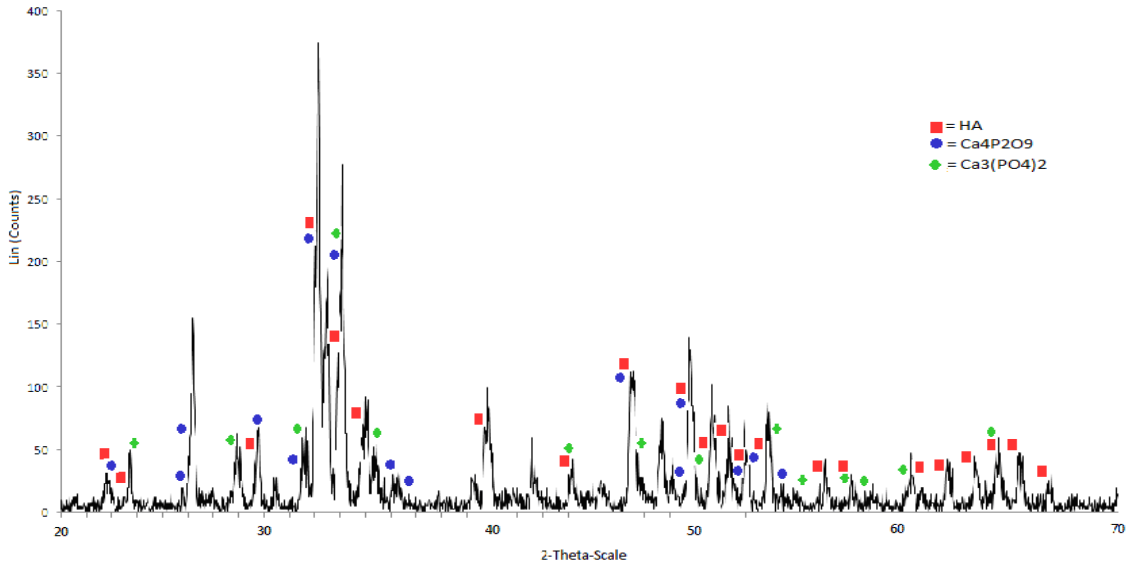
Şekil 4.13. Farklı pH değerlerine sahip HA sentez-numunelerinin [N1-5 (pH=5), N1-7 (pH=7), N1-9 (pH=9) ve N1-12 (pH=12)] ve standart HA'in [269] XRD spektrumları

Biyomalzemeler, çok değişken koşullara sahip olan insan vücudu ortamında kullanılırlar. Vücut sıvılarının pH değeri farklı dokulara göre 1 ile 9 arasında değişir [72]. Ayrıca biyolojik ortamlar için biyomalzeme tasarımı, birbiri ile etkileşen üç ayrı dinamik unsurun varlığından dolayı son derece zordur. Bunlar; biyomalzeme yüzeyinin kimyasal yapısı, biyomalzeme-doku ara yüzey tabakasının kimyasal yapısı, biyomalzemeyi çevreleyen konakçı hücrenin oluşacak biyomalzeme-doku etkileşimine yanıtıdır [73]. Bu nedenlerden dolayı, yapılan HA sentez numunesinin bu dinamik unsurlardan biyomalzeme yüzeyinin kimyasal yapısının kemiğe uyup uymadığını belirlemek amacıyla N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu biyo-greftlere XRD analizi yapılmıştır. Şekil 4.13'de HA sentez malzemesinin pH değerini NH_4OH çözeltisi kullanarak değiştirildikten sonraki (pH=5, 7, 9) XRD analiz sonuçları verilmektedir. XRD analiz sonuçlarına göre, bütün HA sentez biyo-greftlerinin kristalitelerinin yüksek olduğu ve baskın bir şekilde HA fazı görülürken,30-40º arasında düşük miktarda β-TCP fazları da görülmektedir.

Yapılan araştırmalarda sol-gel prosesi sırasında elde edilen süspansiyona ilave edilen malzeme miktarına, kompozisyonuna ve sinterleme sıcaklığına bağlı olarak HA dışında β-TCP ($Ca_3(PO_4)_2$) gibi fazların oluştuğu başka çalışmalarda da görülmektedir [30,269]. β-TCP'nin küçük miktarlarda oluşumu iyonik yerdeğiştirmeyi sağlama ve malzemenin biyoaktifliğini arttırma gibi avantajlar sağlamaktadır [30]. Aynı kompozisyona sahip malzemelerin pH'ları değiştirilerek yapılan XRD incelemeleri sonucu malzemelerde oluşan hidroksiapatit ve β-TCP fazlarının pik pozisyonlarının değişmediği, fakat pH değeri yükseldikçe pik şiddetlerinin azaldığı görülmektedir.

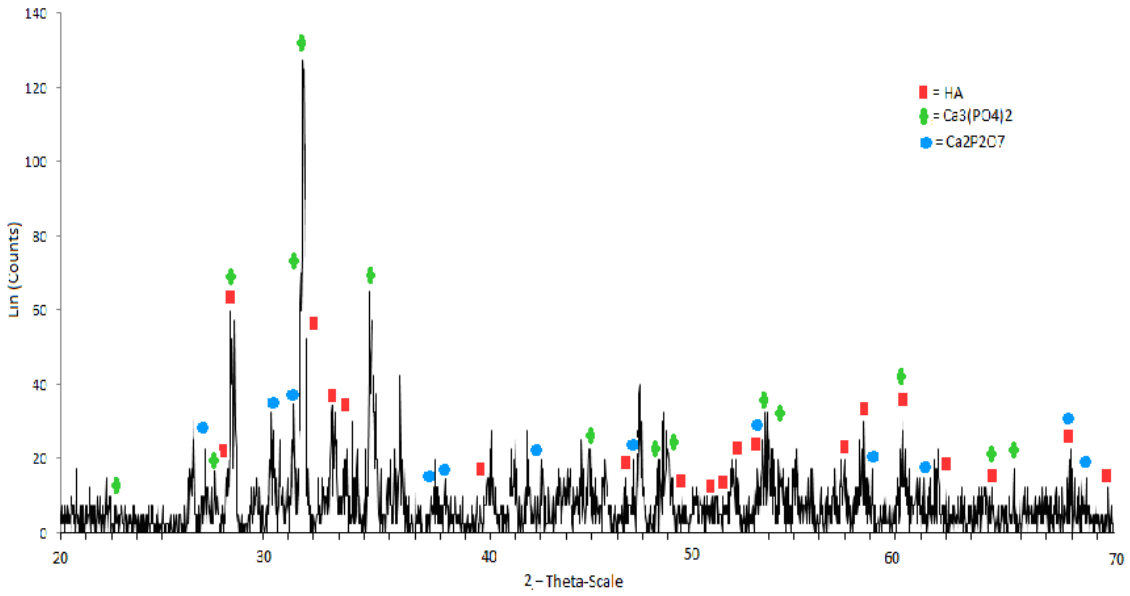
4.2.2. II. Grup Biyo-Greftlerin XRD Sonuçları

Üretilen alternatif biyo-greftlerde ne tür bileşiklerin oluştuğunu incelemek amacıyla XRD analizleri yapılmıştır. Şekil 4.14 ve Şekil 4.16 arasında sol-jel yöntemiyle üretilen hidroksiapatit esaslı biyo-greftlerin XRD analiz sonuçları verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre bütün biyo-greftlerin yüksek kristalliğe sahip olduğu ve yapısında kalsiyum fosfat esaslı fazlarına bağlı piklerin oluştuğu görülmektedir.



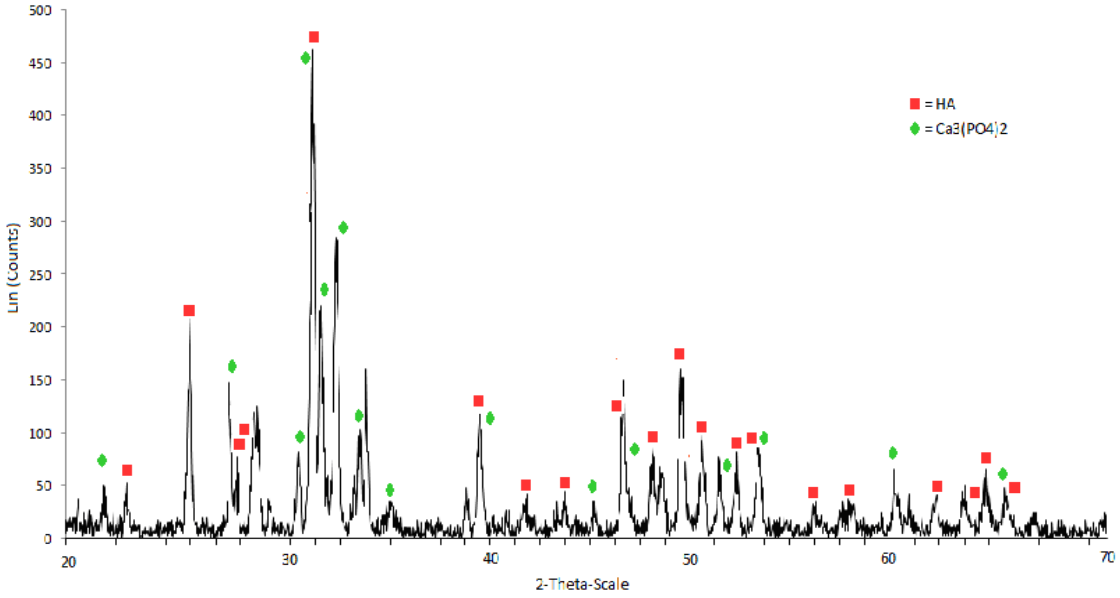
Şekil 4.14. H60 kodlu alternatif biyo-greftin XRD spektrumu.

%60 HA içerikli alternatif biyo-greftin hangi bileşiklerden oluştuğunu incelemek amacıyla yapılan XRD analiz sonucu Şekil 4.14'de verilmektedir. Yapılan inceleme sonucu H60 kodlu biyo-greftte kalsiyum fosfat hidroksitin ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) ve kalsiyum fosfatın ($Ca_4P_2O_9$) baskın fazlar olarak oluştuğu görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.14'de görülen keskin pikler biyo-greftin kristalin yapıda olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.15. H30Ca kodlu alternatif biyo-greftin XRD spektrumu

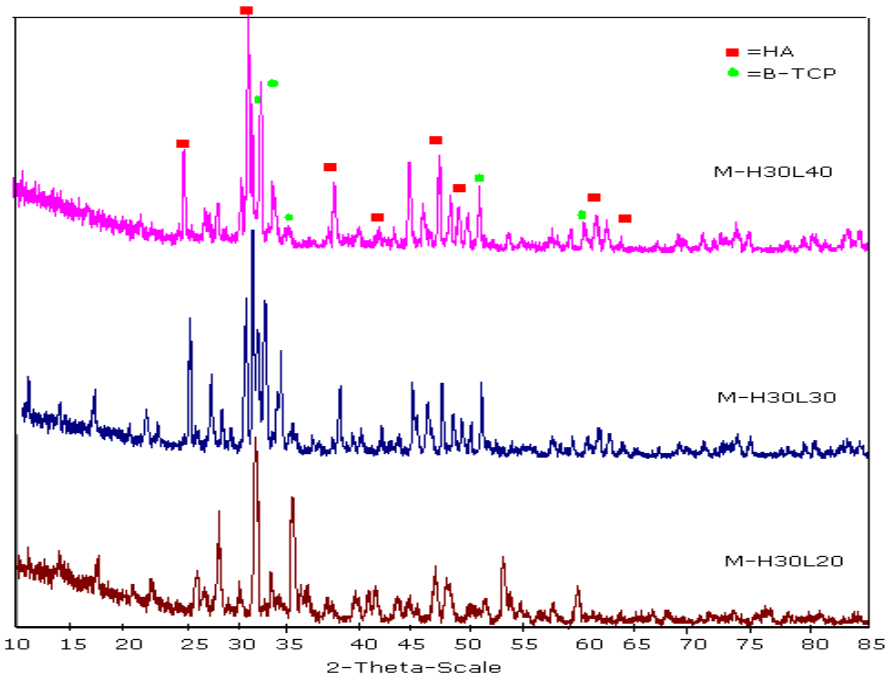
H60 kodlu numuneden farklı olarak yapısında CaO bileşiği bulunduran ve içerdiği bileşik miktarları farklı olan H30Ca kodlu alternatif biyo-greft %30 oranında HA ve %10 oranın da CaO içermektedir. Üretim yöntemleri aynı olan H60 ve H30Ca kodlu biyo-greftlerin yapısında oluşan bileşik farklılıklarının etkisini incelemek amacıyla XRD sonuçlarına bakılmıştır. Yapılan inceleme sonucunda, H30Ca kodlu biyo-greftte H60 kodlu biyo-greftten farklı olarak whitlockite ($Ca(PO_4)_2$) ve hidroksiapatit [$(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) ve $Ca_5(PO_4)_3(OH)$] fazlarının oluştuğu Şekil 4.15'de görülmektedir. Ayrıca, pik şiddetleri kıyaslandığında ise, H60 kodlu biyo-greftin H30Ca kodlu biyo-greftten daha keskin ve yüksek şiddette pikler verdiği de Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de gösterilen spektrumlarda gözlenmektedir.



Şekil 4.16. H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftin XRD spektrumu

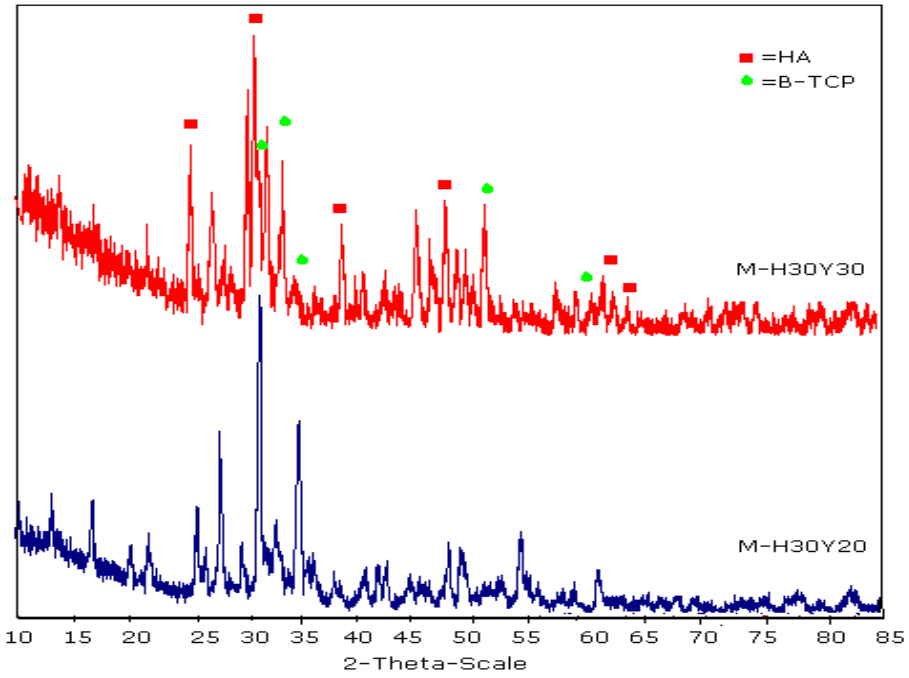
HA esaslı alternatif biyo-greftlerde Yttria'nın (Y_2O_3) kimyasal ve fiziksel etkisini görmek amacıyla yapılan üretimde %50 HA esaslı ve %10 Yttria katkılı (H50Y10 kodlu) biyo-greft kullanılmıştır. Şekil 4.16'da H50Y10 kodlu biyo-greftte oluşan bileşikleri görmek amacıyla XRD analiz sonucu incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucu, H50Y10 kodlu biyo-greft de hidroksiapatit ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$), kalsiyum fosfat hidroksit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), hidroksilfluroksiapatit ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$) ve kalsiyum yttrium fosfat ($Ca_9Y(PO_4)_7$) baskın fazlarının oluştuğu görülürken, oluşan keskin piklerinde biyo-greftin kristalin yapıda olduğunu ispatlamaktadır. H60 ve H30Ca kodlu biyo-greftlerle pik şiddeti kıyaslandığında, H50Y10 kodlu biyo-greftin pik şiddetinin daha yüksek olduğuda Şekil 4.14 ve Şekil 4.16 arasındaki spektrumlarda görülmektedir.

4.2.3. III. Grup (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) Biyo-Greftlerin XRD Analizleri



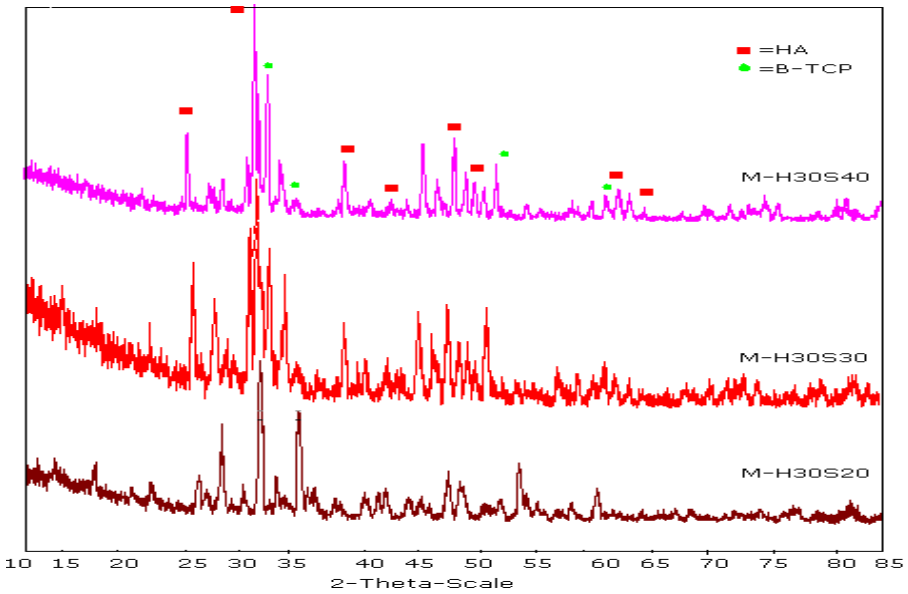
Şekil 4.17. M-H30L20, M-H30L30 ve M-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları

Şekil 4.17 mikron boyutta HA esaslı ve %20, 30, 40 oranlarında lületaşı katkılı (M-H30L20, M-H30L30 VE M-H30L40 kodlu) biyo-greftlerin X ışını kırınımı (XRD) ile elde edilmiş HA ve β-TCP'ye ait pik değerlerini göstermektedir. XRD sonuçları literatür ile kıyaslandığında, benzer şiddetler de HA ve β-TCP fazlarını verdiği gözlenmektedir [199]. Ayrıca piklerin genişliği ve uzunluğu arttıkça kristallitesi artmakta ve tane boyutu düşmektedir[199]. Böylece sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz farklı lületaşı oranlarına sahip biyo-greftler de lületaşı miktarı arttıkça piklerin daha dar ve uzun olduğu gözlenmektedir. Bu sonuç, lületaşı miktarı arttıkça tane boyutunun arttığını ve yüksek bir kristal yapının oluştuğunu göstermektedir.



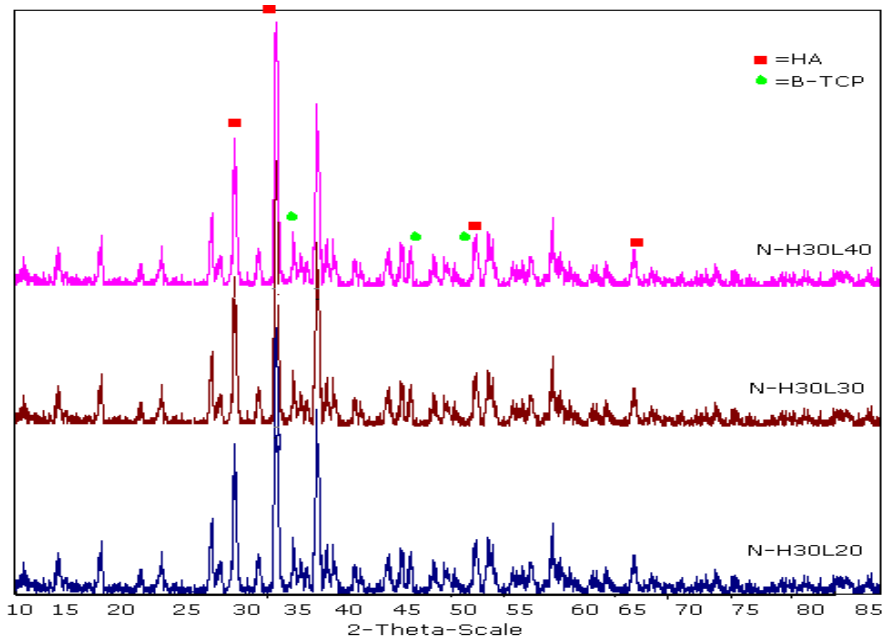
Şekil 4.18. M-H30Y20 ve M-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları

Mikron boyutta HA esaslı ve %20 ve %30 oranlarında yumurta kabuğu tozu katkılı (M-H30Y20 ve M-H30Y30 kodlu) biyo-greftlerin XRD sonuçları Şekil 4.18'de verilmektedir. 10-85º'lik açı aralığın da yumurta kabuğu içerikli biyo-greftlerin benzer sonuçlar verdiği, fakat yumurta kabuğu tozu miktarı arttıkça pikin uzunluğunun artıp, genişliğinin daraldığı gözlenmektedir.



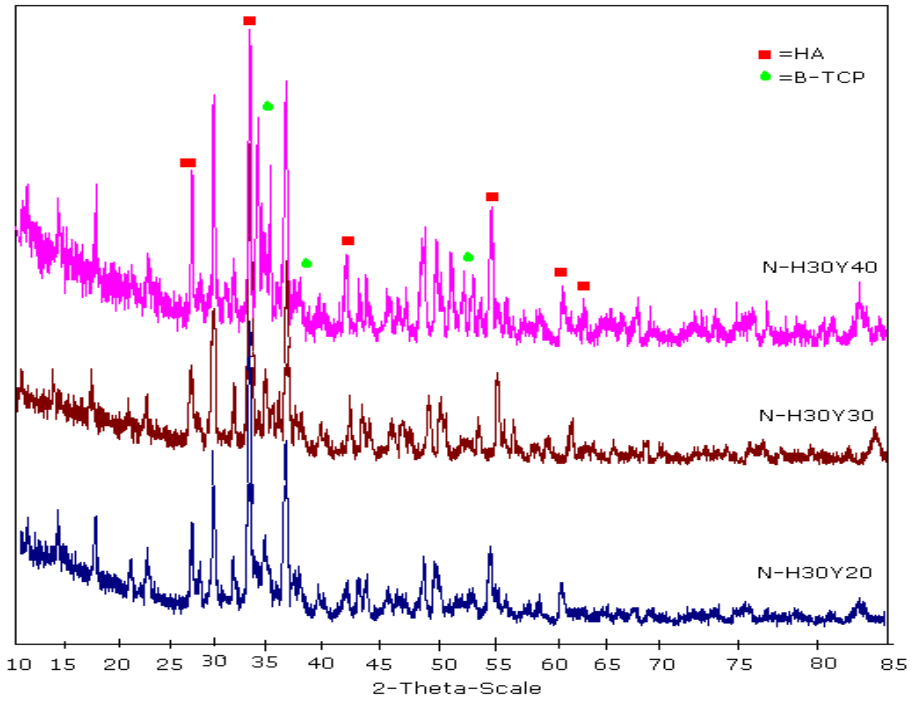
Şekil 4.19. M-H30S20, M-H30S30 ve M-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları

Biyo-greftlerin iç yapılarında bulunan fazların belirlenebilmesi için XRD analiz metodu kullanılmıştır. XRD kullanılarak 2θ değerleri 10º ve 85º olacak şekilde taranmıştır. Şekil 4.19'da M-H30S20, M-H30S30 ve M-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları verilmektedir. Yapılan XRD analizleri sonucu, şiddeti yüksek olan pik yoğunluğunun 25 º ve 40 º arasında olduğu gözlenmektedir. Literatürde kıyaslandığında, bu piklerin HA ve β-TCP fazlarına denk geldiği gözlenmektedir.



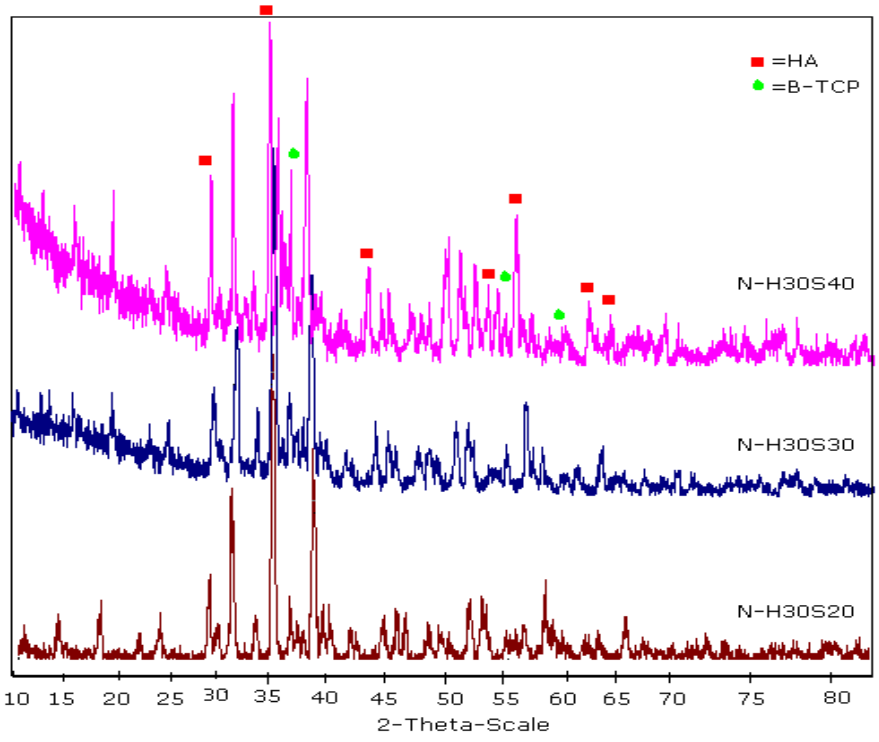
Şekil 4.20. N-H30L20, N-H30L30 ve N-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları

Nano boyutta HA esaslı ve lületaşı katkılı (N-H30L20, N-H30L30 ve N-H30L40 kodlu) biyo-greftlerin X ışınları difraksiyonu (XRD) ile kalitatif analizi yapılmış ve sonuçları da Şekil 4.20'de verilmiştir. XRD grafiklerinde bütün piklerin HA ve β-TCP'ye ait olduğu görülmektedir. Lületaşı miktarı arttıkça piklerin şiddetinin arttığı gözlenmektedir. %20 ve %30 lületaşı içerikli biyo-greftler de piklerin geniş ve düzensiz yapısı, henüz kristalizasyon işleminin tamamlanmadığını göstermektedir. Lületaşı miktarı arttıkça piklerde görülen keskinlik ve daralma kristalleşmenin arttığı ve tanelerin irileştiğini belirtmektedir. Ayrıca XRD sonuçlarından, lületaşı miktarının artmasıyla HA ve β-TCP'de herhangi bir faz değişiminin olmadığı gözlenmektedir.



Şekil 4.21. N-H30Y20, N-H30Y30 ve N-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları

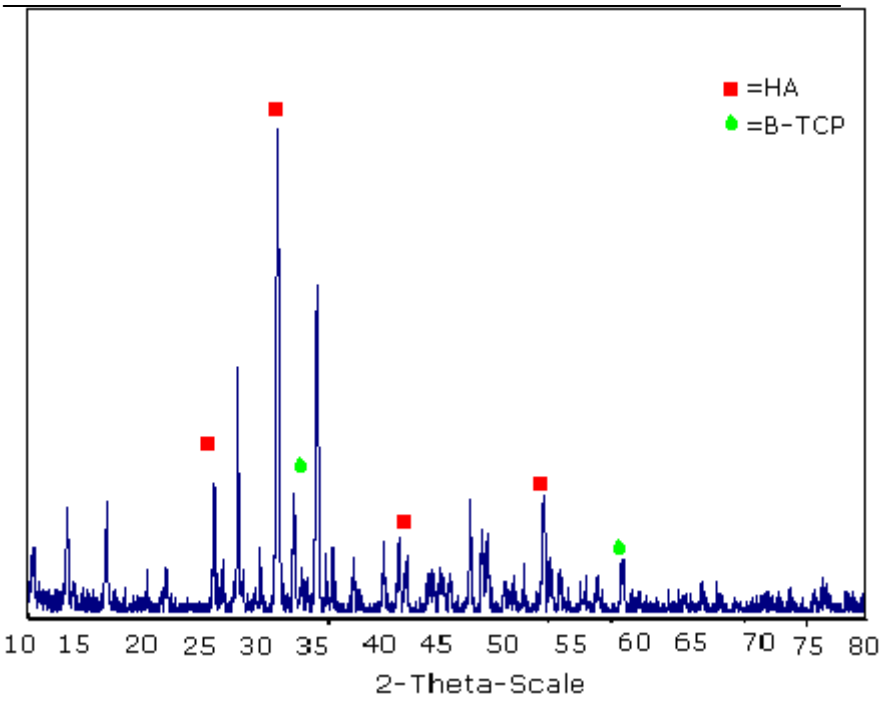
Şekil 4.21 nano boyutta HA esaslı ve %20, 30, 40 oranlarında yumurta kabuğu tozu katkılı (N-H30Y20, N-H30Y30 ve N-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerin XRD analiz sonuçlarını vermektedir. XRD analiz sonuçlarına göre, yumurta kabuğu tozu miktarının artmasıyla birlikte piklerin şiddetinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca %20 yumurta kabuğu içerikli biyo-greftte diğer biyo-greftlere göre daha düzensiz ve geniş pikler gözlenmiştir. Yumurta kabuğu miktarı arttıkça difüzyon mekanizmasının işleyişi daha kolay olmuş ve bu yüzden yumurta kabuğu tanelerinin komşu tanelerle birleşerek irileşmesinin kolaylaşmasından dolayı piklerin daha dar ve keskin olmasını sağladığı şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 4.22. N-H30S20, N-H30S30 ve N-H30S40 kodlu alternatif biyo - greftlerin XRD spektrumları

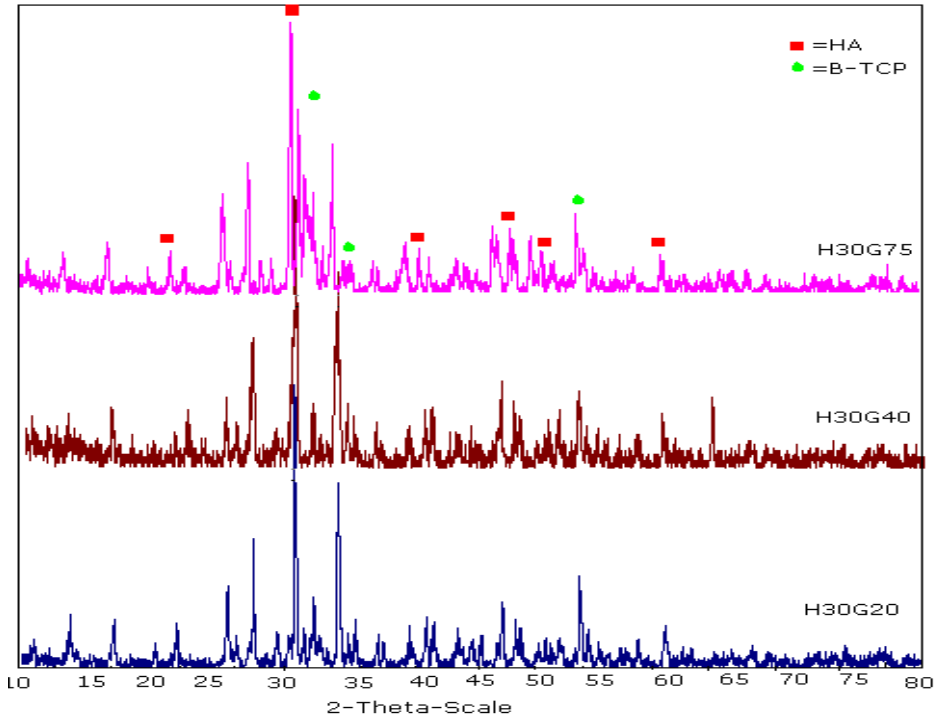
Şekil 4.22 nano boyutta HA esaslı ve %20, 30, 40 oranlarında sübye kemiği tozu katkılı (N-H30S20, N-H30S30 ve N-H30S40 kodlu) biyo-greftlerin XRD analiz sonuçlarını vermektedir. Analiz sonuçlarına göre, bütün biyo-greftler benzer açılarda benzer pikler verdiği görülürken, sübye kemiği miktarı arttıkça HA ve β-TCP'de herhangi bir faz değişiminin olmadığı gözlenmektedir. Sübye kemiği miktarı %20'den %30'a arttıkça pik genişliğinde büyük bir değişimin olmadığı, fakat pik uzunluğun da artış olduğu görülmektedir. Ayrıca %40 sübye kemiği içerikli biyo-greftte diğer (N-H30S20 ve N-H30S30 kodlu) biyo-greftlere göre, belirgin bir şekilde pik genişliğinin azalıp, pik uzunluğunun arttığı belirlenmektedir.

4.2.4. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Tozu Esaslı) Biyo-Greftlerin XRD Analizleri



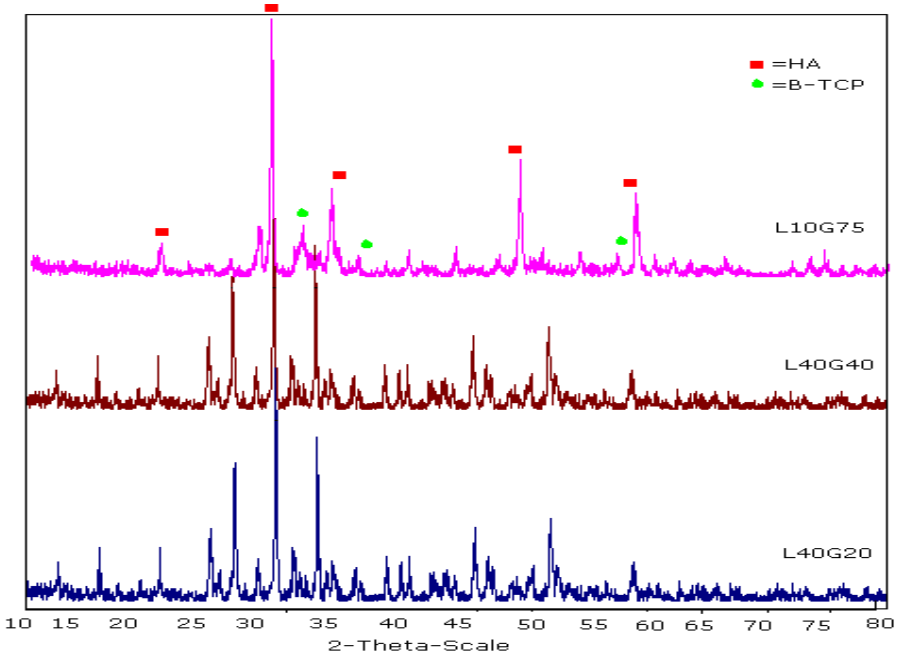
Şekil 4.23. H40ZrYt kodlu alternatif biyo-greftin XRD spektrumu

HA esaslı ve %10 Zr ile %10 Yttria katkılı biyo-greftin XRD analiz sonucu Şekil 4.23'de verilmektedir. XRD analiz sonucun da H40ZrYt kodlu biyo-greftte HA ve β-TCP fazlarının oluştuğu görülürken, piklerin dar ve keskin olduğu gözlenmektedir. Piklerin dar ve keskin olması biyo-greftin yüksek kristal yapıda ve tanelerin iri olduğunu göstermektedir.



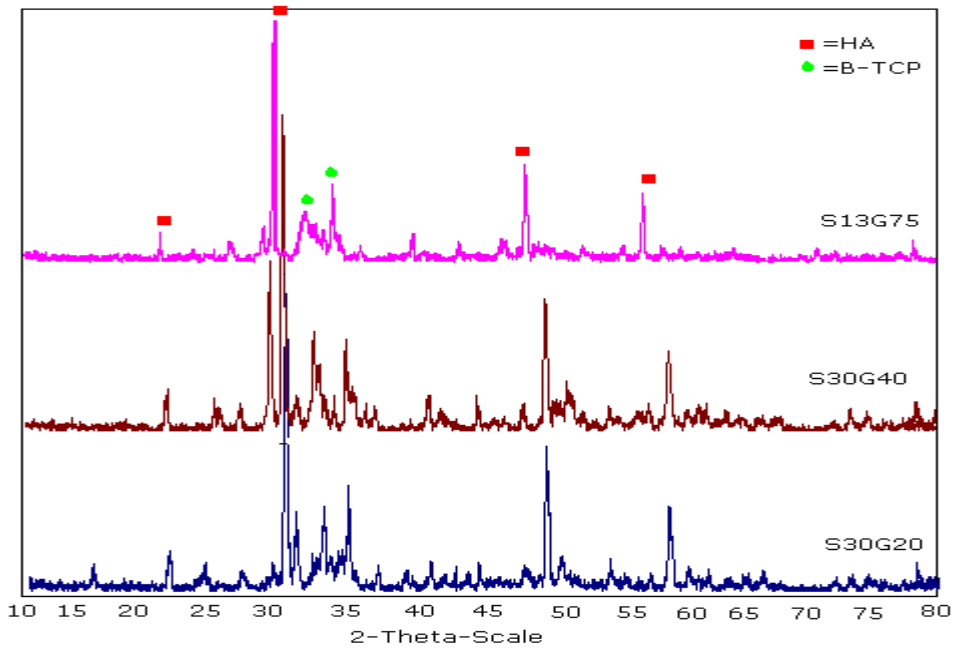
Şekil 4.24. H30G20, H30G30 ve H30G40 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları

HA esaslı biyo-greftlerde poroz yapı elde edebilmek için polimer malzeme (jelatin) ilave edilmiştir. Böylece jelatin yüksek sıcaklıkta numuneden uzaklaşarak bulunduğu bölge de boşluk oluşmasını sağlayacaktır. Şekil 4.24'de poroz yapıya sahip HA esaslı ve %20, %40 ve %75 oranlarında jelatin katkılı biyo-greftlerin XRD sonuçları verilmektedir. XRD analiz sonuçlarına göre, III. grupta yer alan kompakt yapıdaki HA esaslı biyo-greftlerin tam tersi, IV. grupta yer alan poroz biyo-greftlerin jelatin miktarı arttıkça pik genişliğinin artıp, pik yüksekliğinin azaldığı görülmektedir. Bu sonuç H30G20, H30G30 ve H30G40 kodlu biyo-greftlerin SEM görüntüleriyle birlikte XRD analiz sonuçları karşılaştırıldığında, jelatin miktarı arttıkça por miktarının artmasına bağlı olarak kristal yapının azalıp, tane boyutunun azaldığı şeklinde yorumlanabilir.



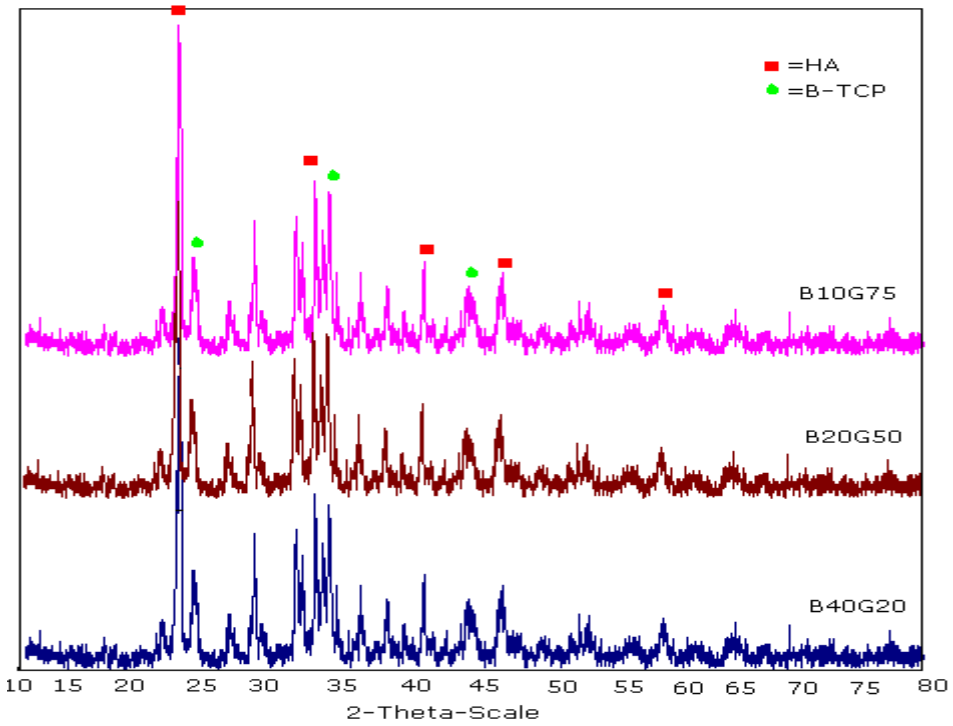
Şekil 4.25. L40G20, L40G40 ve L10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları

Şekil 4.25 %10 ve %40 oranlarında lületaşı esaslı ve %20-75 oranları arasında jelatin içerikli (L40G20, L40G40 ve L10G75 kodlu) biyo-greftlerin XRD analiz sonuçlarını vermektedir. XRD analiz sonuçlarından, L40G20 ve L40G40 kodlu biyo-greftlerin aynı açılar da HA ve β-TCP fazlarını verdiği görülürken, piklerin dar ve keskin olduğu da gözlenmektedir. Piklerin dar ve keskin olması L40G20 ve L40G40 kodlu biyo-greftlerin yüksek kristal yapıda ve tanelerinin iri olduğunu göstermektedir. L10G75 kodlu biyo-greftin XRD analiz sonucunda ise, L40G20 ve L40G40 kodlu biyo-greftlere göre benzer açılarda HA ve β-TCP fazlarını verdiği ve por miktarı daha fazla olduğu için piklerinin daha geniş ve pik uzunluğunun daha az olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.26. S30G20, S30G40 ve S13G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları

Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz sübye kemiği esaslı ve %20-75 oranları arasında jelatin içerikli (S30G20, S30G40 ve S13G75 kodlu) alternatif biyo-greftlerin XRD analiz sonuçları Şekil 4.26'da verilmektedir. Spektrumlardan S30G20, S30G40 ve S13G75 kodlu biyo-greftlerin bütün piklerinin HA ve β-TCP'ye ait olduğu görülmektedir. Jelatin miktarı arttıkça piklerin şiddetinin azaldığı görülürken, geniş ve düzensiz yapının arttığı gözlenmektedir. Piklerin geniş ve düzensiz yapısı, henüz kristalizasyon işleminin tamamlanmadığını ve tanelerin boyutunun azaldığını göstermektedir. XRD sonuçlarından, jelatin miktarının artmasıyla HA ve β-TCP'de herhangi bir faz değişiminin olmadığı belirlenmektedir.



Şekil 4.27. B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin XRD spektrumları

Poroz yapıya sahip biyocam esaslı ve %20, 50, 75 oranlarında jelatin katkılı (B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu) biyo-greftlerin XRD analiz sonuçları Şekil 4.27'de verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre, bütün biyo-greftler benzer açılarda benzer pikler verdiği görülürken, jelatin miktarı arttıkça HA ve β-TCP'de herhangi bir faz değişiminin olmadığı gözlenmektedir. Ayrıca jelatin miktarı arttıkça pik genişliğinde büyük bir değişimin olmadığı, fakat pik uzunluğun da azalma olduğu görülmektedir.

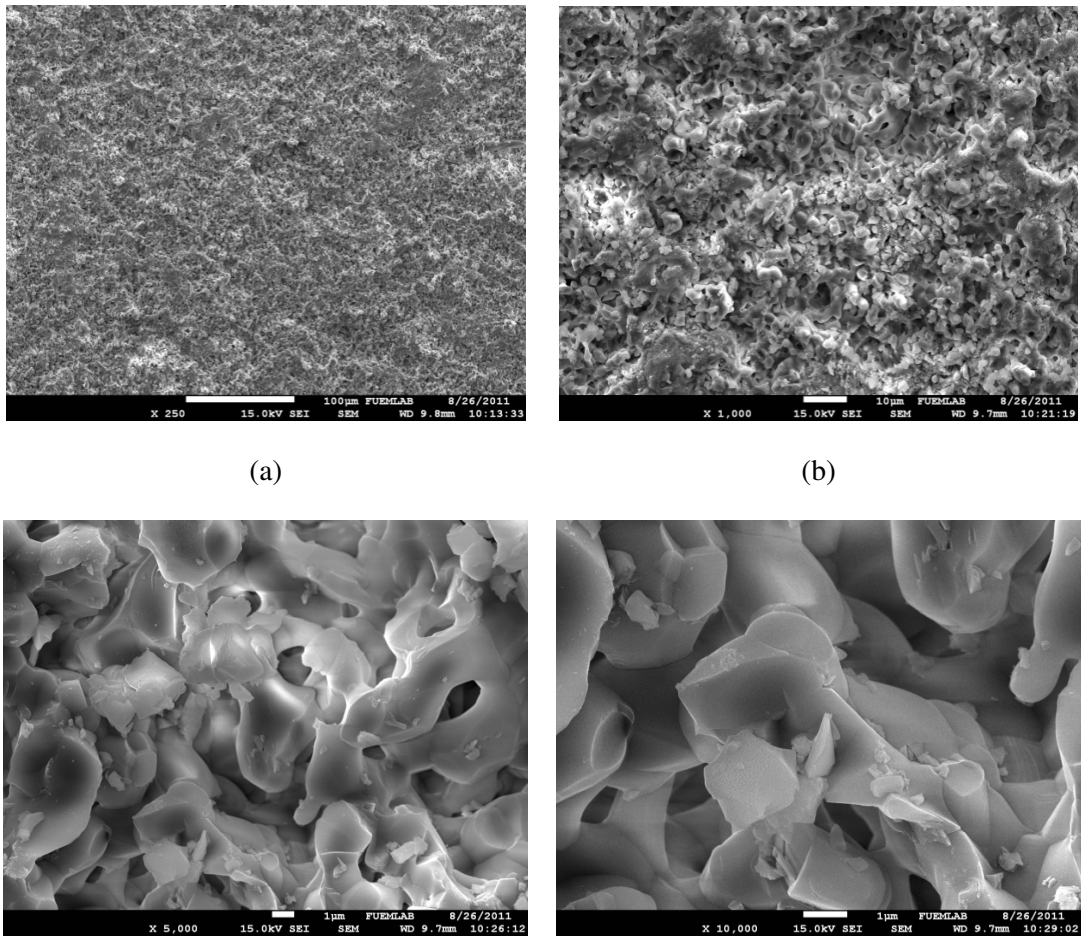
4.3.SEM ve EDX Analizleri

Sentezlenen örneklerin morfolojilerini (tane büyüklükleri ve tane dağılımları) belirlemek için SEM (JEOL JSM-7001F Taramalı Elektron Mikroskobu) cihazı kullanılmıştır. Elementel analiz SEM elektron mikroskobuna bağlı enerji dağıtıcı X-ışını analizörü (EDX) ile gerçekleştirilmiştir. Bütün alternatif biyo-greft örnekleri SEM-EDX analizi için vakum atmosferinde altın ile kaplanmış ve yine vakum atmosferinde incelenmiştir.

4.3.1. I. Grup Biyo-Greftlerin SEM-EDX Analizleri

Son yıllarda kalsiyum fosfatlar üzerinde yapılan çalışmaların sonucunda, bu malzemelerin sağlık alanındaki uygulamaları ve kullanımı oldukça artmıştır. Kalsiyum fosfatlar vücudun içerisinde yüksek biyouyumluluk göstermektedirler. Bu özellikleri yüzünden yük taşınması

gerekmeyen bölgelerde kullanılmaları daha uygundur [203]. Kalsiyum fosfatlar içerisinde en öne çıkan malzemeler ise hidroksiapatit (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) ve üç-kalsiyum fosfattır (TCP, $Ca_3(PO_4)_2$). HA yüksek biyouyumluluğu, yavaş bozunması, kimyasal yapısının kemik mineraline benzerlik göstermesinden dolayı ve TCP ise vücut içindeki yüksek bozunma hızından dolayı önemlidir. HA'nın zayıf olan mekanik özelliklerini güçlendirmek ve biyolojik özelliklerini daha yüksek seviyelere çıkartmak amacı ile nano kristalli HA üretilmesi konusunda yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Şu anda yeni trend ise tek fazlı HA veya TCP üretilmesi yerine çift fazlı HA ve TCP içeren kompozitlerin üretilmesidir. Bu şekilde biyouyumluluk veya mekanik özellikler yönünden özellikleri yükseltilmiş biyo-greftler üretilebilmesidir [203]. Bizde bu amaçlara paralel olarak, mevcut tez çalışmasını gerçekleştirdik.



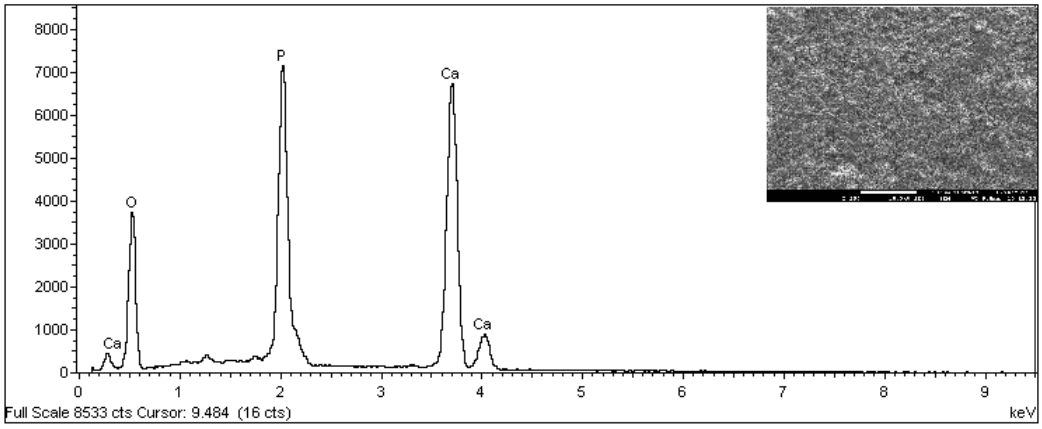
(a) (b)

(c) (d)

Şekil 4.28. N1-12 kodlu HA sentez numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri. (a) X250, (b) X1000, (c) X5000, (d) X10 000.

Malzemenin kararlılığını, sinterlenme şartları ve mekanik özellikleri etkileyen ve belirleyen başlıca faktörler; malzemenin kimyasal kompozisyonu, tane boyutu ve yüzey morfolojisidir. Bu

çalışma ile de görülmüştür ki, HA sentezlenirken ortamın pH derecesi de oldukça önemli bir parametredir. Bu nedenle Şekil 4.28'de $Ca(OH)_2$ ve fosforik asit kullanılarak sol-jel yöntemiyle üretilen ve pH=12 değerine sahip HA sentez numunesinin (N1-12 kodlu) farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri verilmiştir. Çekilen mikroskobik görüntüler sonucunda X250 ve X1000 büyütmede alternatif biyo-greftin düşük yoğunluk rejimine sahip olduğu ve yüzeyde makroporozitelerin oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.28 (a,c)). Ayrıca poroz yapının dışında sıvı faz sinterlemesi görüldüğü için tane sınırlarının tam belirgin olmadığı ve karışık bir partikül dağılımının oluştuğu da X5000 ve X10 000 büyütmelerde görülmektedir (Şekil 4.28 (b-d)).



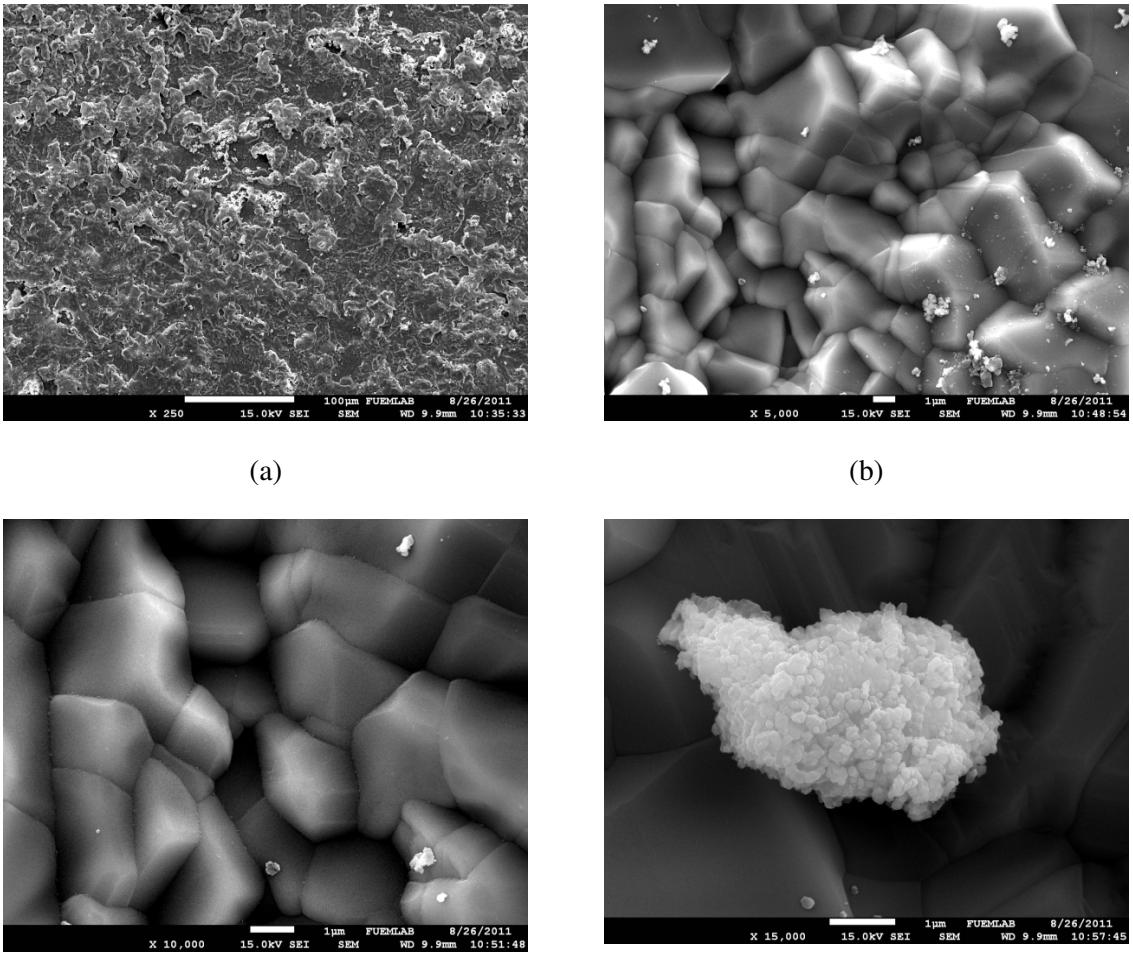
(a)

Element	O	Ca	P
%Ağırlık	0.30	0.16	0.23
%Atomik Ağırlık	60.19	13.76	19.05

(b)

Şekil 4.29. N1-12 kodlu biyo-greftin X250 büyütmeden alınan EDX spektrumu

Şekil 4.29 (a,b)'de N1-12 kodlu alternatif biyo-greftten genel olarak alınan (X250 büyütmede) EDX spektrumu ve analizin alındığı bölgenin SEM görüntüsü verilmektedir. EDX analizi sonucunda biyo-greftte yüksek miktarda O ve düşük miktarda da Ca ve P elementlerinin oluştuğu tespit edilmiştir. Buna bağlı olarakta kalsiyum fosfat içerikli fazların oluştuğu belirlenmiştir.

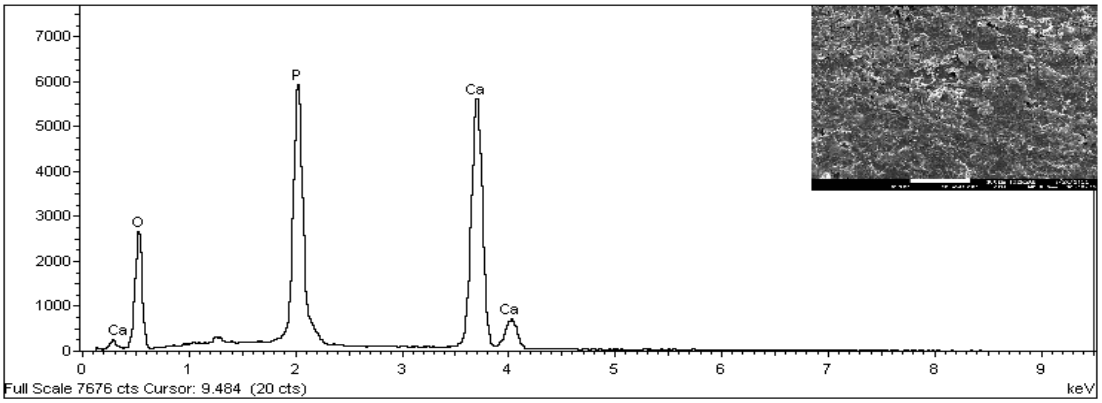


(a) (b)

(c) (d)

Şekil 4.30. pH=5 olan N1-5 kodlu HA sentez numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü (a)X250, (b)X5000, (c)X10000, (d)X15000 .

N1-12 kodlu biyo-greftin pH değeri fosforik asit ve NH_4OH kullanılarak 5 değerine düşürülüp, pH farklılığının morfolojik etkilerini incelemek amacıyla SEM görüntüsü alınmıştır. Şekil 4.30 (a)'da X250 büyütmede verilen SEM görüntüsü sonucu düzensiz, katmanlı bir yapının oluştuğu görülürken, oluşan sıvı faz sinterlemesi sonucu tane sınırlarının tam belirgin olmadığı X10 000 büyütmede görülmektedir. Şekil 4.30(d)'deki X15 000 büyütmede ise yüzeyde aglomera bir şekilde oluşan apatit tanelerinin oluştuğu gözlenmektedir. N1-12 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında, N1-5 kodlu biyo-greftde porozitenin daha az ve tanelerin daha düzenli olduğu, normal tane düzeninin dışında yüzeyde aglomerasyona uğramış apatit tanelerinin oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca numunede farklı boyutlara sahip tanelerin oluştuğu ve bunların düzensiz olduğu Şekil 4.30(a-d)'de görülmektedir.

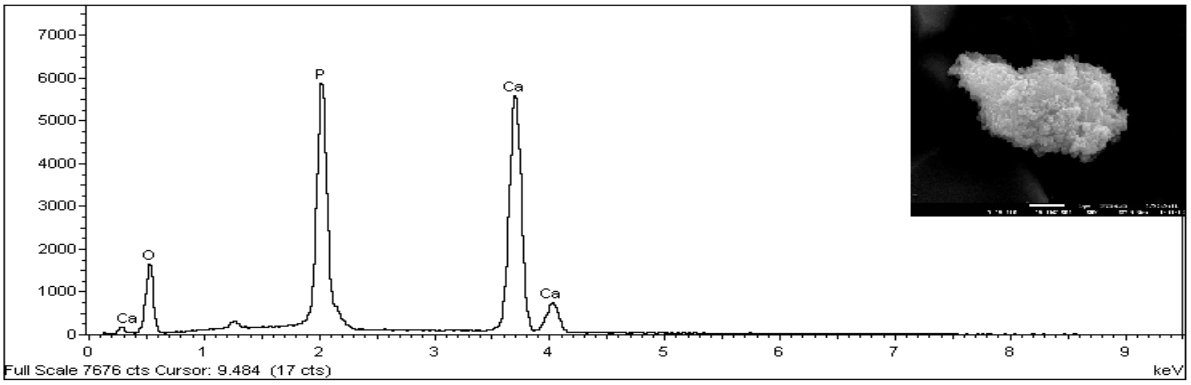


(a)

Element	O	P	Ca
% Ağırlık	0.35	0.18	0.26
%Atomik Ağırlık	64.40	14.86	20.54

(b)

(A)



(a)

Element	O	P	K
% Ağırlık	0.41	0.21	0.30
%Atomik Ağırlık	56.07	18.42	25.51

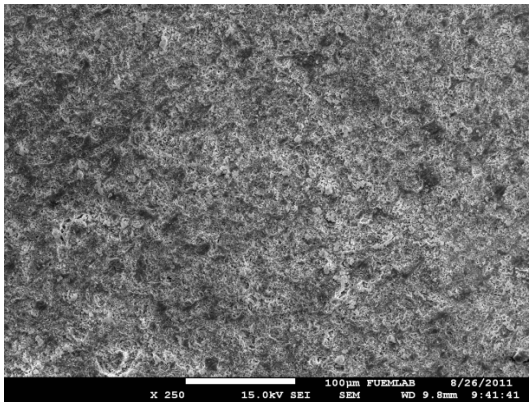
(b)

(B)

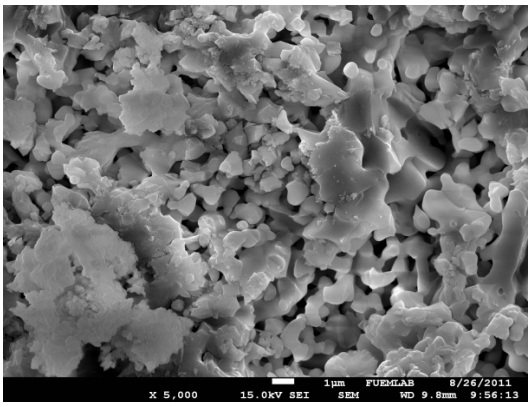
Şekil 4.31. N1-5 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede (A) ve X15000 büyütmede (B) alınan EDX spektrumları

Şekil 4.31'de N1-5 kodlu alternatif biyo-greftte oluşan kimyasal bileşimi bulabilmek için genel olarak ve yüzeyde oluşan apatit tanelerinden alınan EDX spektrumları verilmiştir. Elde edilen spektrumlardan bütün numunelerde kalsiyum fosfat içerikli bileşiklerin oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.31). Genel olarak ve apatit tanesinden alınan EDX analiz sonuçlarına göre

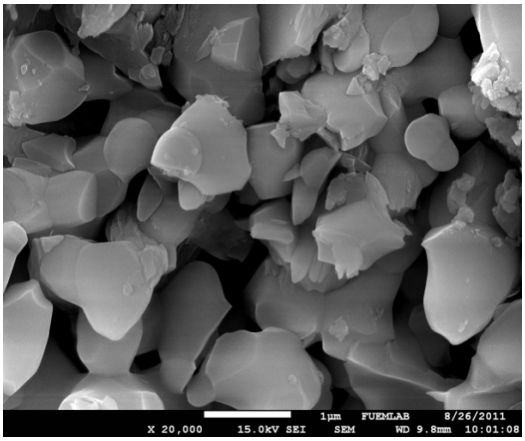
yapıda yüksek miktarda O ve Ca ve düşük miktarda da P bulunduğu tespit edilirken, bu oranların apatit tanesinin EDX sonucunda daha düşük olduğu da gözlemlenmiştir.



(a)



(b)

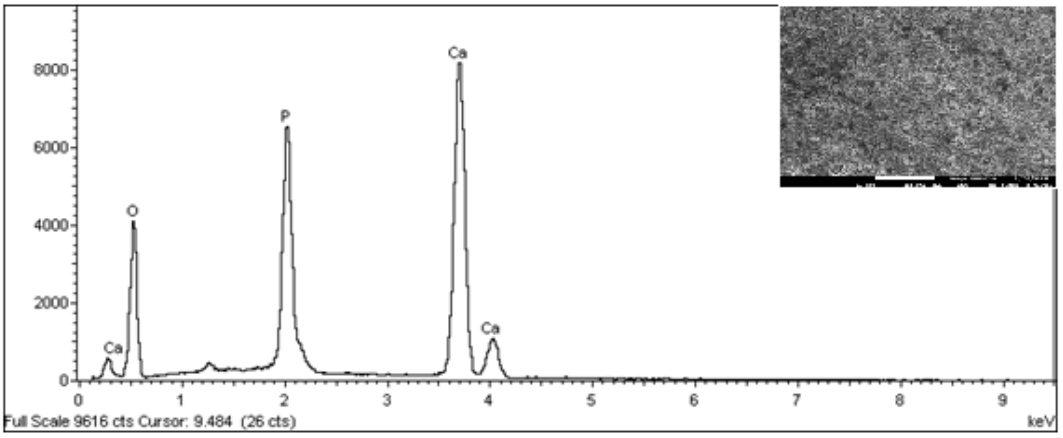


(c)

Şekil 4.32. pH=7 olan N1-7 kodlu HA sentez numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü (a) X250, (b) X5 000, (c) X20 000.

Şekil 4.32(a-c)'de fosforik asit kullanılarak pH değeri 12'den 7 ye düşürülen N1-7 kodlu biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü verilmektedir. X250 büyütmede N1-7 kodlu biyo-greft de karışık bir tane dağılımının oluştuğu ve normal tane düzeninin dışında düz koyu renkte apatit bölgelerinin oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.32(a)). X5000 ve X20 000 büyütmede tane dağılımının düzensiz bir yapıda olduğu ve tane sınırlarının net olarak görüldüğü gözlenirken, sinterleme sonrası taneler arası boşlukların oluştuğu da tespit edilmiştir(Şekil 4.32 (b-c)). Ayrıca

N1-7 kodlu biyo-greftin N1-5 kodlu biyo-grefte göre daha fazla poroziteye sahip olduğu ve N1-12 kodlu biyo-grefte göre de tanelerin ve porozite boyutlarının daha küçük olduğu görülmektedir.



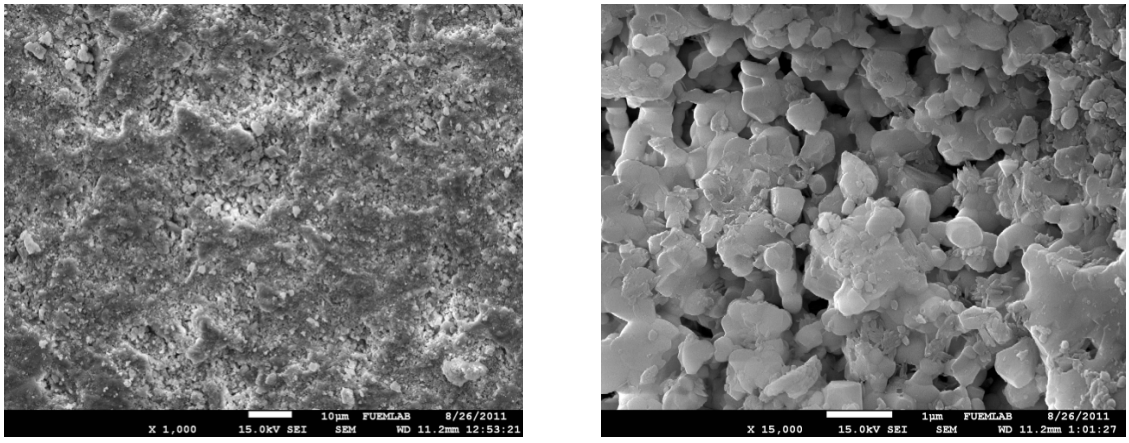
(a)

Element	O	Ca	P
% Ağırlık	0.29	0.04	0.23
%Atomik Ağırlık	67.88	11.30	20.82

(b)

Şekil 4.33. N1-7 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede EDX spektrumu

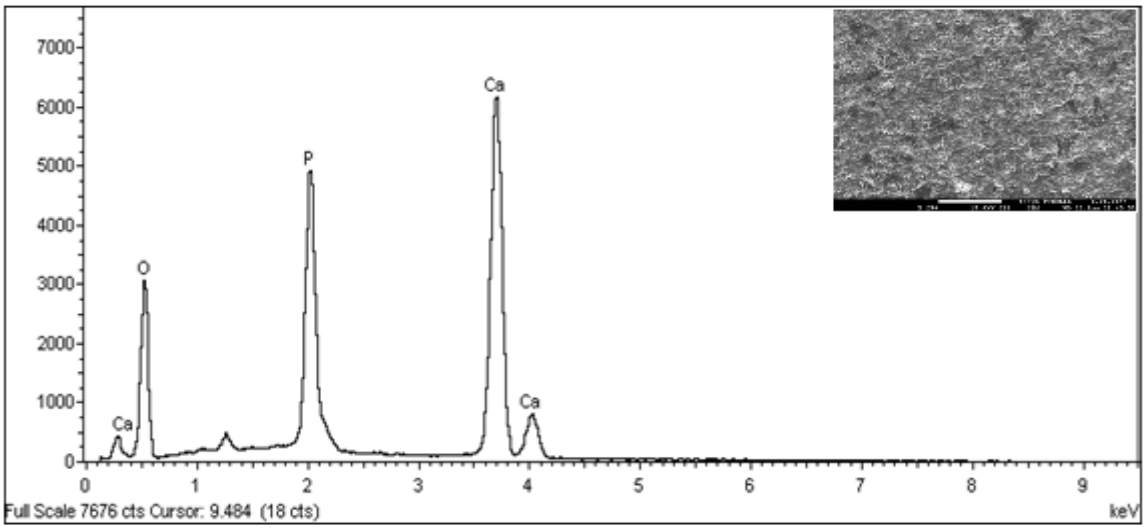
N1-7 kodlu alternatif biyo-greftin kimyasal bileşimini tespit etmek amacıyla X250 büyütmede genel olarak EDX analizi yapılmıştır. Şekil 4.33'de gösterilen EDX spektrumu sonucu ve analiz bölgesinden alınan görüntü sonucu N1-7 kodlu biyo-greftde kalsiyum fosfat bileşiğine bağlı fazların oluştuğu tespit edilmiştir(Şekil 4.33(a)). Buna bağlı olarak, yapıda yüksek oranda O ve düşük oranda da Ca ve P elementlerinin oluşduğu gözlenmektedir. N1-12 ve N1-7 kodlu biyo-greftler kıyaslandığında, N1-7 kodlu biyo-greftte O ve P miktarının yüksek Ca miktarının düşük olduğu belirlenmiştir. N1-5 kodlu biyo-greftte ise, N1-7 kodlu biyo-grefte göre P miktarının düşük O ve Ca miktarının yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



(a) (b)

Şekil 4.34. pH=9 olan N1-9 kodlu HA sentez numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü, (a) X1 000, (b) X15000.

Sol-jel yöntemiyle üretilen hidroksiapatit bileşiklerinin fosforik asit ve NH_4OH kullanılarak yapılan pH değişiminde pH değeri 12'den 9'a düşürülerek N1-9 kodlu numune üretilmiştir ve Şekil 4.34 (a-b)'de gösterilen farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri çekilmiş ve pH değişimin numune üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuçta N1-9 kodlu numunede Şekil 4.34 (a-b)'de gösterildiği gibi karışık tane düzeniyle birlikte tanelerarası bölgelerde koyu renkte apatit içerikli bölgelerin oluştuğu gözlenmiştir. Farklı pH değerlerine (pH= 5,7,12) sahip diğer numuneler ile kıyaslandığında ise N1-7 kodlu biyo-grefte göre daha büyük tanelerin, ara bölgelere göre de daha küçük tanelerin oluştuğu ve boşluk miktarının N1-7 kodlu biyo-grefte göre düşük olduğu tespit edilmiştir. N1-12 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında ise, tane boyutunun ve tanelerarası boşluk çaplarının daha küçük olduğu görülmüştür.

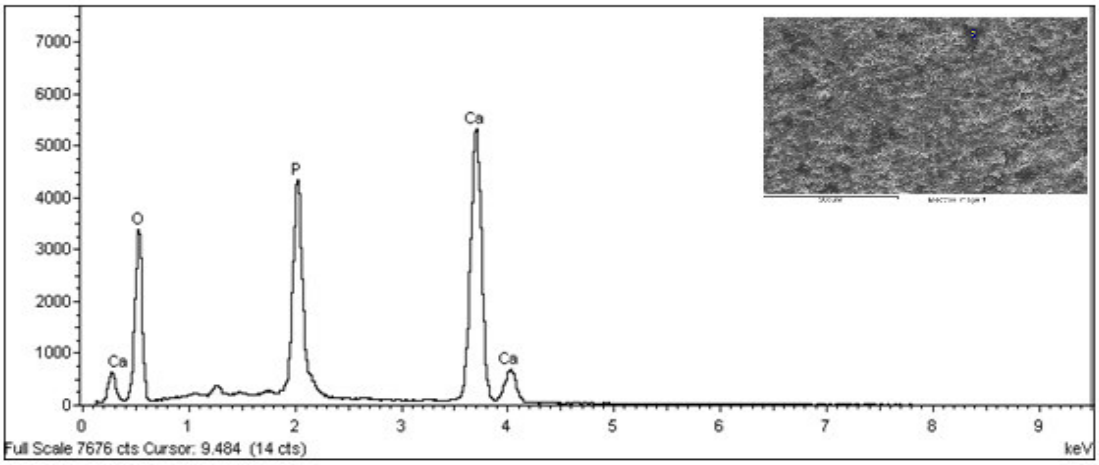


(a)

Element	O	P	Ca
% Ağırlık	0.33	0.16	0.26
% Atomik Ağırlık	67.93	11.42	20.65

(b)

(A)



(a)

Element	O	P	Ca
%Ağırlık	0.32	0.16	0.25
%Atomik Ağırlık	71.29	10.37	18.34

(b)

(B)

Şekil 4.35. N1-9 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak (A) ve apatit taneleri üzerinden alınan (B) EDX spektrumları

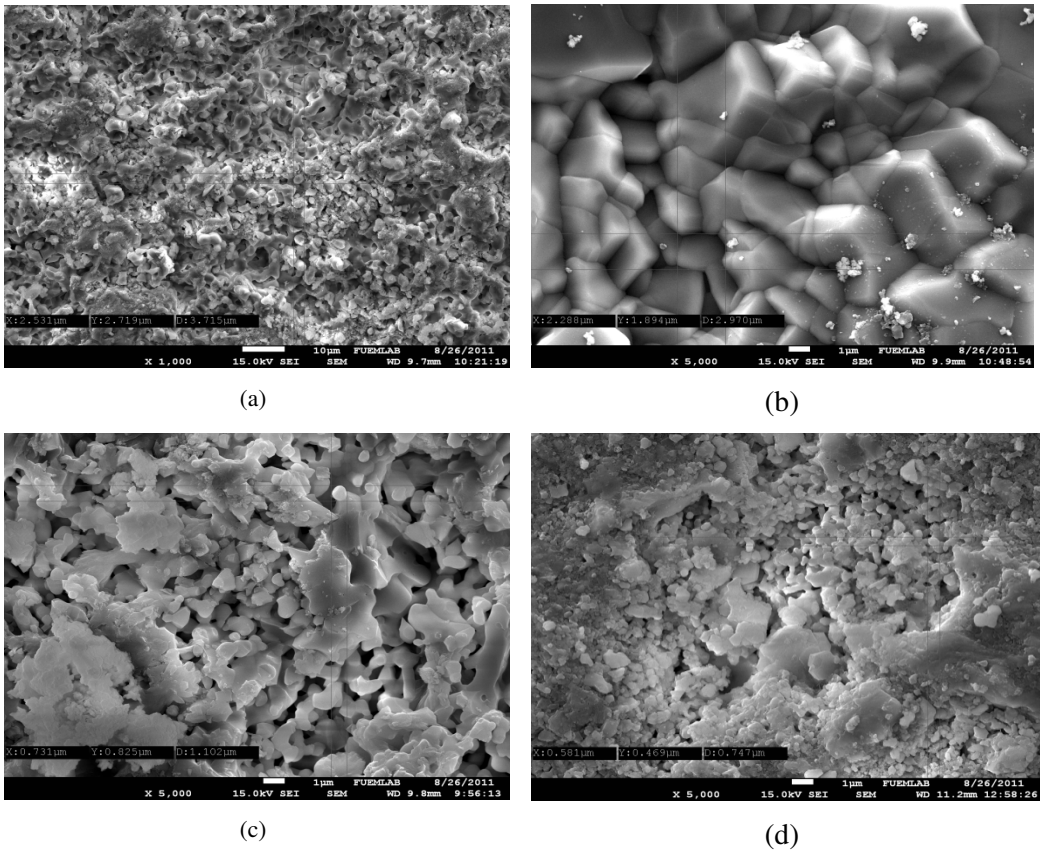
Şekil 4.35'de N1-9 kodlu biyo-greftin X250 büyütmeden genel olarak (Şekil 4.35(A)) ve apatit taneleri üzerinden noktasal olarak alınan(Şekil 4.35(B)) analiz sonuçlarına göre, her iki

sonuçtada yapıda Ca, P ve O elementlerinin bulunduğu görülürken, alınan sonuçlar hem genel hemde noktasal olarak yüzde oranlarının birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Her iki sonuçtan, yapıda kalsiyum fosfat bileşiklerinin oluştuğu belirlenmiştir.

N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu alternatif biyo-greftler karşılaştırıldığında, pH değeri yükseldikçe O miktarının arttığı ve Ca ile P miktarının düştüğü gözlenmiştir. N1-12 kodlu biyo-greftte ise, N1-9 kodlu iyo-grefte göre, O miktarının düşük, Ca ve P miktarının yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.3.1.1.Üretilen Hidroksiapatitlerin Partikül Boyut Analizi

Toz karakteristiklerini belirlemek için yapılan testlerde tozların kimyasal özellikleri, parçacık şekli, fiziksel ve mekanik özellikleri üzerinde durulmuştur. Bu çerçevede HA sentezi için üretilen kemik greftleri tozunun bileşimini belirlemek için EDX analizi yapılırken, SEM-EDX analiz cihazıyla HA sentez numunelerinin boyut analizi de yapılmıştır.



Şekil 4.36. HA sentez numunelerinin X5000 büyütmede boyut analizinin yapıldığı yüzey görüntüleri, (a) N1-12, (b) N1-5, (c) N1-7, (d) N1-9 kodlu biyo-greftler.

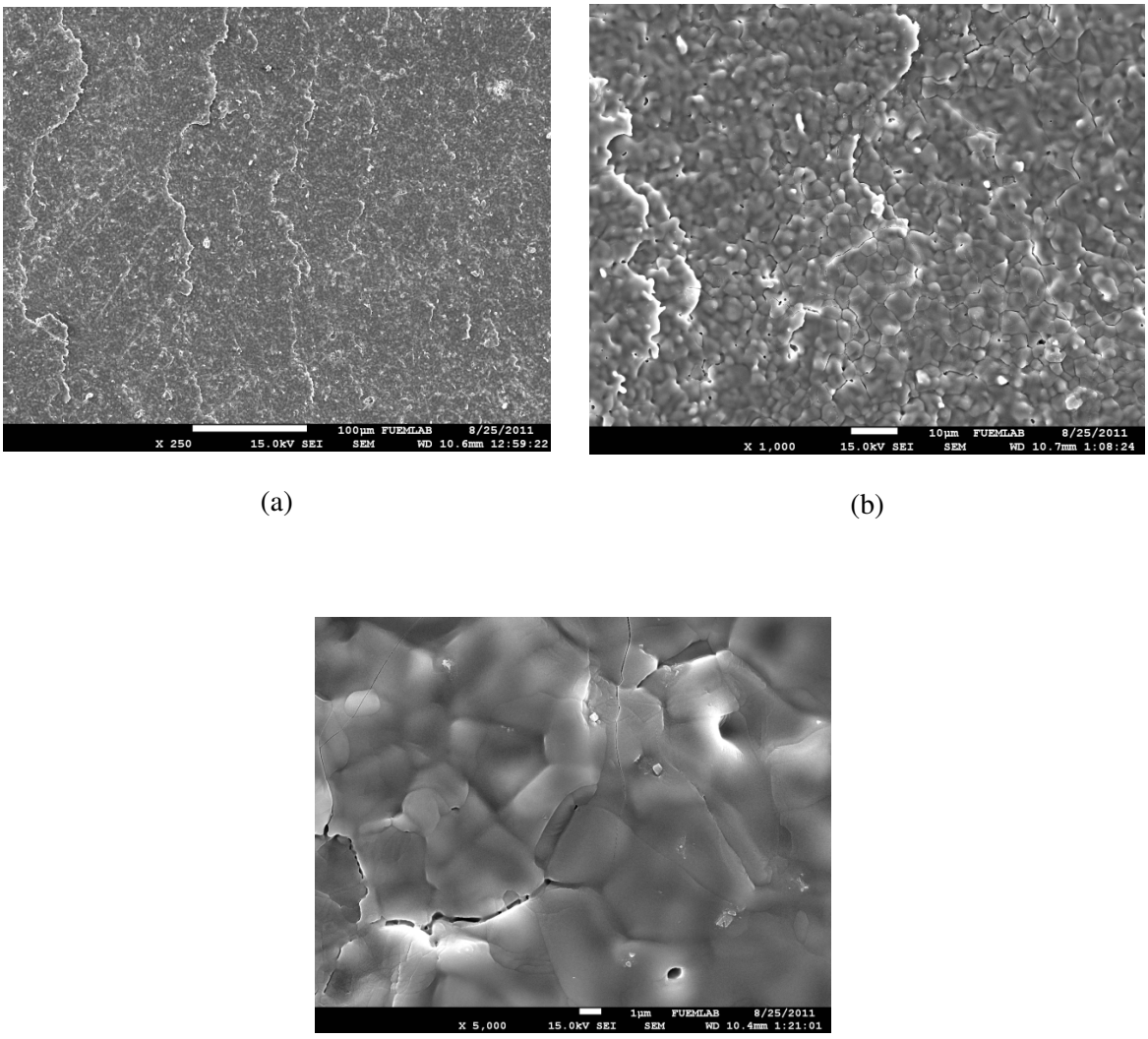
Tablo 4.1. Farklı pH değerlerine sahip biyo-greftlerin boyut analizi sonuçları

Numune	1. ölçüm (µm)	2. ölçüm(µm)	3. ölçüm(µm)	Ortalama tane boyutu (µm)
N1-12	3.715	3.980	6.773	4.822
N1-5	2.712	3.577	0.916	2.401
N1-7	0.864	1.102	1.659	1.208
N1-9	0.747	0.385	0.915	0.682

$CaCO_3$ ve fosforik asit kullanılarak üretilen hidroksiapatit tozlarının SEM cihazından alınan boyut analiz bölgelerinin görüntüleri ve değerleri Şekil 4.36 ve Tablo 4.1'de verilmektedir. Bütün numunelerin tane boyutları Tablo 4.1'de gösterildigi gibi 0-5 µm arasında değişmektedir. N1-12 kodlu alternatif biyo-greftin pH değeri en yüksek olup (pH=12) tane boyutu da en yüksek olandır. N1-12 kodlu biyo-greftin pH değeri NH_4OH ve fosforik asit kullanılarak 5 (N1-5), 7(N1-7) ve 9 (N1-9) yapılmıştır ve pH farkının tane boyutu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuçta pH değeri 5-9 arasına yükseldikçe tane boyutunun düştüğü görülmüştür. Fakat bu düşüşe rağmen pH'ı değiştirilen numunelerin boyutlarının N1-12 kodlu numuneye (pH=12) göre daha düşük tane boyutuna sahip olduğu da görülmektedir.

4.3.2. II. Grup Biyo-Greftlerin SEM-EDX Analizleri

Çalışmanın bu bölümünde, nano boyutta HA'e farklı oranlarda KH_2PO_4, Na_2CO_3, CaO, P_2O_5 ve Yttria ilave edilerek bu bileşiklerin densifikasyon, sinterlenebilirlik ve mekanik özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Sol-jel yöntemiyle üretilen alternatif biyo-greftlerin morfolojik yapılarını inceleyip bu yapıların mekanik ve fiziksel özellikler üzerine etkilerini incelemek amacıyla SEM-EDX incelemeleri yapılmıştır.

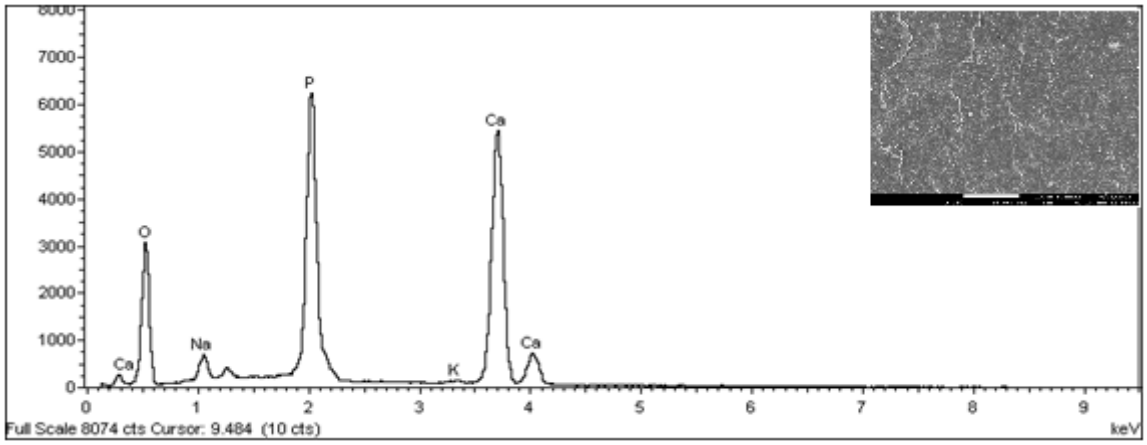


(a) (b)

(c)

Şekil 4.37. H60 kodlu biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Şekil 4.37'de %60 HA esaslı alternatif biyo-greftin (H60 kodlu) X250-X5000 büyütmeler arasındaki SEM görüntüleri verilmektedir. Şekil 4.37(a)'da verilen H60 kodlu biyo-greftin X250 büyütmedeki SEM görüntüsünden, lamelli yapı (katmanlı) şeklinde yüzey görüntüsünün oluştuğu görülmektedir. Şekil 4.37(b)'ye göre tane sınırları, bazı bölgelerde net görülürken bazı bölgelerde tane sınırları sıvı faz sinterlenmesinden dolayı belirgin bir şekilde görülmemektedir. Ayrıca sıvı faz sinterlemesine bağlı olarak, taneler irili ufaklı olup, tanelerin belirgin olduğu bölgelerde tane dağılımı homojen değildir (Şekil 4.37(c)). X5000 büyütmede ise tane sınırlarında boşlukların ve taneler arası çatlakların oluştuğu ve tane sınırlarında oluşan bu boşlukların çatlak başlangıç noktalarını oluşturduğu görülmektedir.



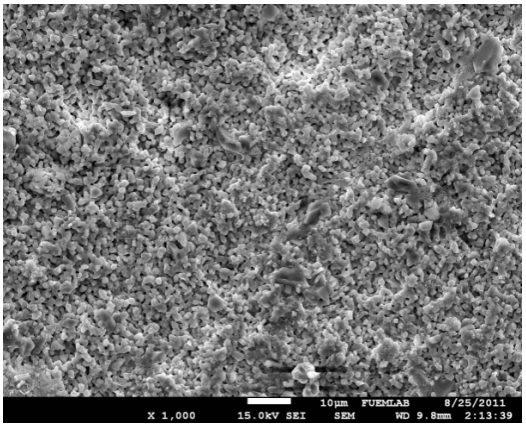
(a)

Element	O	Na	P	K	Ca
% Ağırlık	0.33	0.08	0.10	0.03	0.24
%Atomik Ağırlık	4.42	2.00	14.78	0.06	18.64

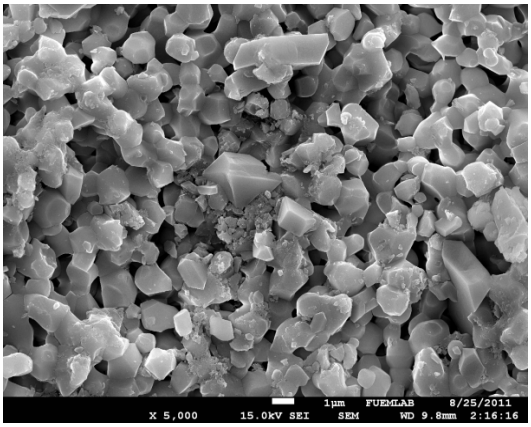
(b)

Şekil 4.38. H60 kodlu biyo-greftin X250 büyütmedeki EDX spektrumu

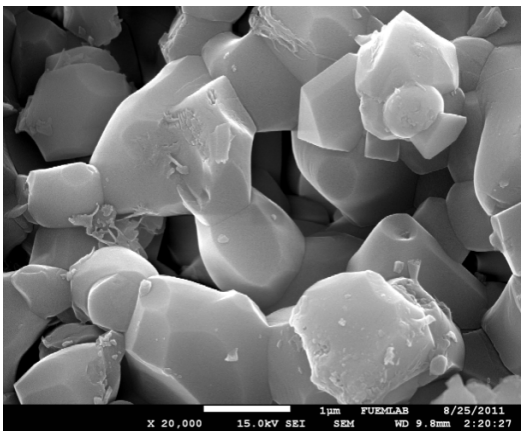
Toz karakteristiklerini belirlemek için yaptığımız testlerde tozların kimyasal özellikleri ve parçacık şeklinin malzeme üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çerçevede sinterleme sonrası %60 HA esaslı alternatif biyo-greftin (H60 kodlu) kimyasal bileşimini belirlemek için EDX analizi yapılmıştır. Şekil 4.38(a-b)'de X250 büyütmede genel olarak alınan EDX analiz sonuçları verilmiştir. EDX analiz sonucunda sinterleme sonrası H60 kodlu biyo-greftte O, Na, P, K, Ca elementlerinin olduğu görülmesine rağmen, Ca ve P fazlarının ana elementler olarak görülmesi elde edilen biyo-greftte istenilen fazlarca (Ca ve P) zengin olduğunu göstermektedir.



(a)



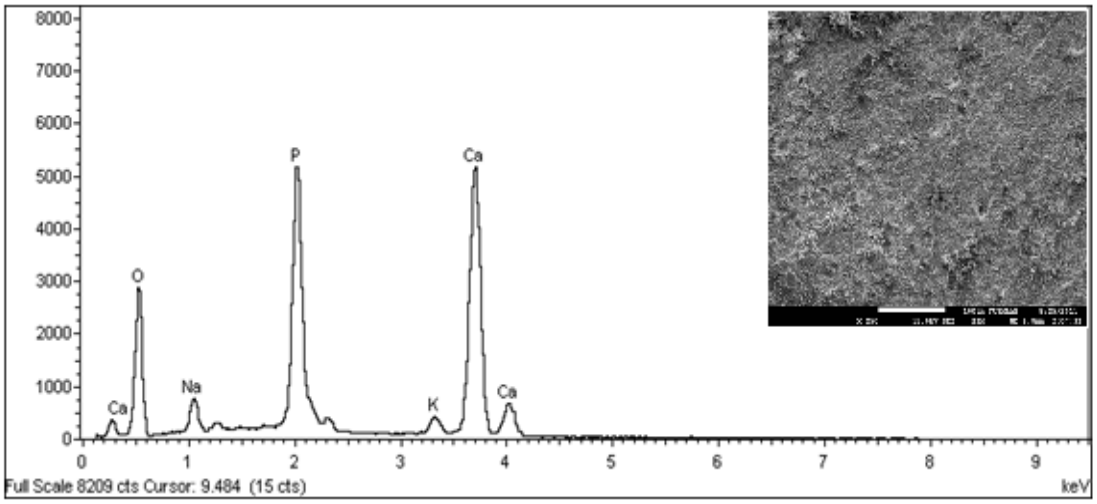
(b)



(c)

Şekil 4.39. H30Ca kodlu biyo-greftin (a) X1000, (b) X5000, (c) X20 000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Tek yönlü soğuk isostatik preslenip (24 N kuvvet ile), kontrollü atmosferde 1180°C de 150 dak. sinterlenen %30 HA ve %10 CaO içerikli (H30Ca kodlu) alternatif biyo-greftin X1000 (Şekil 4.39(a)), X5000 (Şekil 4.39(b)) ve X20 000 (Şekil 4.39(c)) büyütmeler arasındaki SEM görüntüleri verilmektedir. X1000 büyütmedeki SEM görüntüsünden, tane dağılımı farklı iki bölge oluştuğu Şekil 4.39(a)'da verilmektedir. İki bölgeden birinci bölgede üniform bir tane dağılımı ve bölge bölge koyu renkte apatit parçalarının oluştuğu görülürken, diğer bölgelerde koyu renkteki apatit tanelerinin oranının arttığı görülmektedir. X5000 ve X20 000 büyütmelerdeki görüntülerde ise, düzensiz bir tane şekli ve dağılımının oluştuğu ve sinterleme sonrası ikili taneler arasındaki sinter bağıyla birlikte tam bir yoğunluk oluşmadığı için taneler arasında boşlukların oluştuğu Şekil 4.39(b,c)'de görülmektedir.



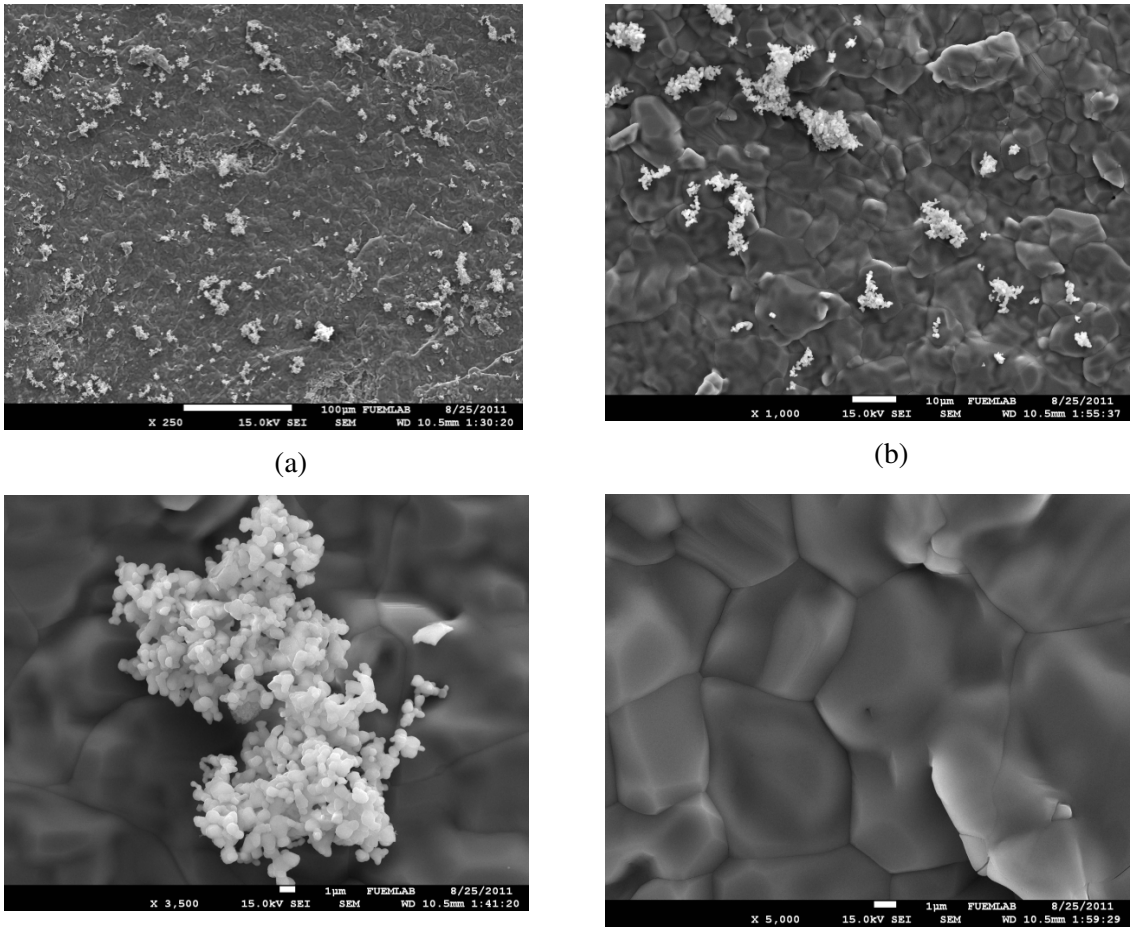
(a)

Element	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık	0.35	0.08	0.17	0.07	0.25
% Atomik Ağırlık	64.80	2.58	12.93	1.03	18.60

(b)

Şekil 4.40. H30Ca kodlu biyo-greftin X250 büyütmede EDX spektrumu

Şekil 4.40'da %30 HA ve %10CaO içerikli (H30Ca kodlu) biyo-greftin presleme ve sinterleme sonrası X250 büyütmede EDX analiz spektrumu verilmektedir. Alternatif biyo-greftin kimyasal özelliklerini belirlemek için alınan EDX analiz sonucu numunede O, Na, P, K ve Ca elementlerinin bulunduğu görülmektedir. H30Ca kodlu biyo-greftte yüksek miktarda Ca, P ve O elementlerinin ve düşük miktarda da Na ve K elementlerinin bulunduğu tespit edilmiştir.



(a) (b)

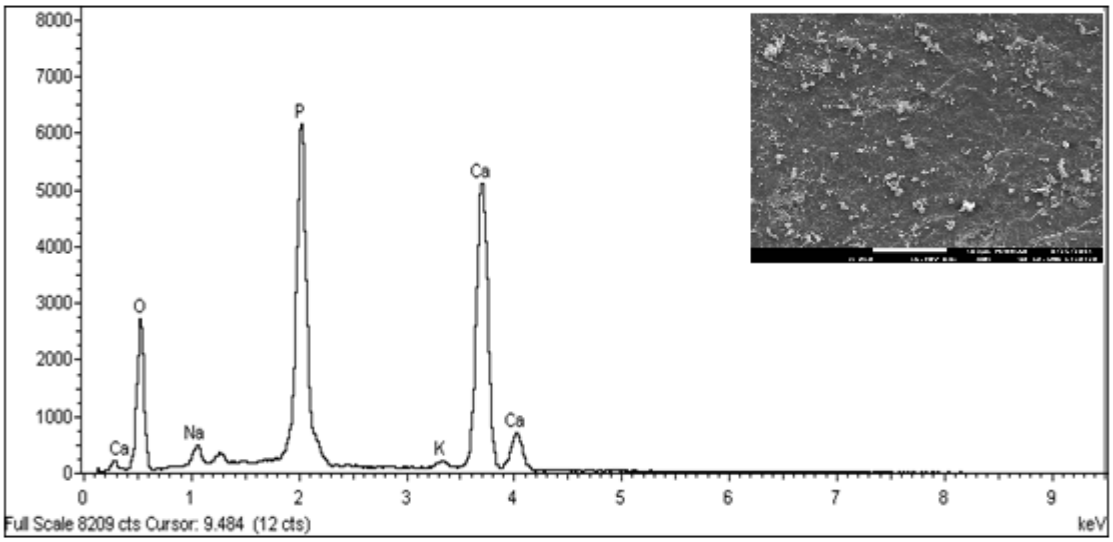
(c) (d)

Şekil 4.41. H50Y10 kodlu biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X3500, (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

HA içerisine çok farklı iyonlar eklenmesi neticesinde HA'nın iç yapısında bazı değişiklikler meydana gelebilir. Özellikle HA'nın hegzagonal kafes parametrelerinde değişiklikler oluşabilir. Bunu gözlemlemek amacıyla üretilen %50 HA esaslı ve %10 Yttria katkılı (H50Y10 kodlu) alternatif biyo-greftin X250-X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.41(a-d)'de verilmektedir. Bütün mikroskobik görüntüler sonucunda, biyo-greftte homojen ve poroz olmayan yapıların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.41(a-d)). Ayrıca yüzeyde homojen bir şekilde dağılan ve aglomerasyona uğramış apatit taneleri (Şekil 4.41 (a-d)) ve sinterleme sonrası numunede sıvı faz sinterlemesinden dolayı tane sınırlarının tam olarak belirgin olmadığı ve yoğun bir densifikasyon oluştuğu da Şekil 4.41(d)'de görülmektedir.

HA içerisine Mg^{+2}, Zr^{+2}, Cd^{+2} ve Y^{+3} gibi bazı iyonlar eklenebilir. Bu iyonlar eklenerek HA'nın iç yapısında ve hegzagonal kafes parametrelerinde değişiklikler elde edilmiştir[29]. İyon eklenmiş nano HA greftlerde Ca katyonunun yerini aldıklarında malzemenin hegzagonal hücre hacminin azaldığı görülmüştür. Osteoblast hücrelerinin Y^{+3} eklenmiş HA lere yapışmasının saf HA e yapışmasından daha fazla olduğu ve özellikle +3 değerli bileşiklerin osteoblastlara yapışma oranının +2 değerlikli bileşiklerden fazla olduğu görülmüştür [29]. Dolayısıyla, bu çalışmada,

Yttria bileşiğinin bu özelliğinden faydalanmak için %50 oranında HA içerisine %10 oranında yttria katarak süspansiyon hazırlanmış ve $Y^{+}3$'ün etkileri incelenmiştir.

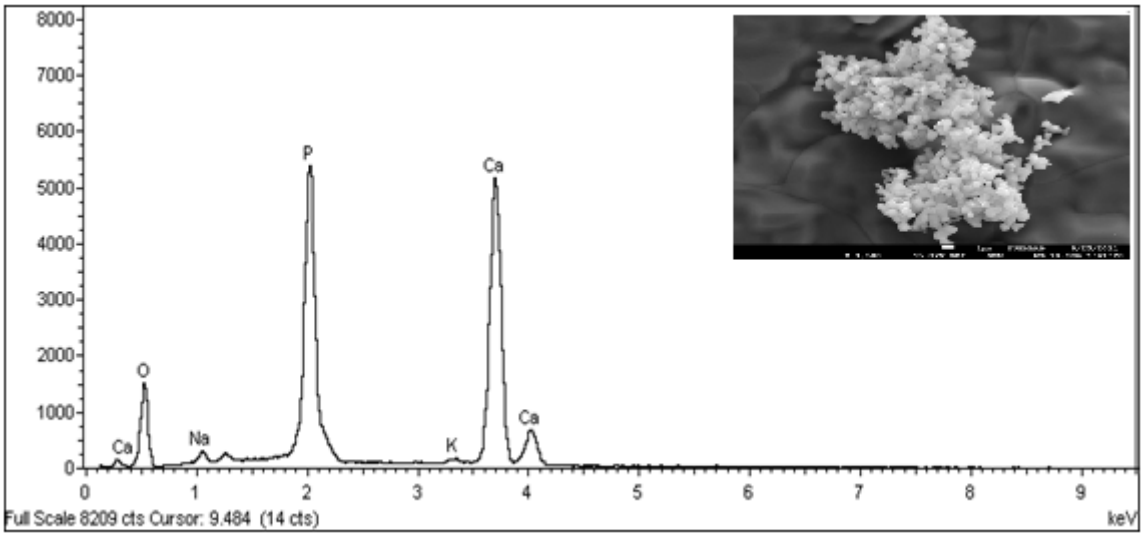


(a)

Element	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık	0.35	0.07	0.19	0.06	0.25
%Atomik Ağırlık	63.37	1.44	15.36	0.40	19.44

(b)

(A)



(a)

Element	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık	0.35	0.08	0.17	0.07	0.25
%Atomik Ağırlık	64.86	2.58	12.93	1.03	18.60

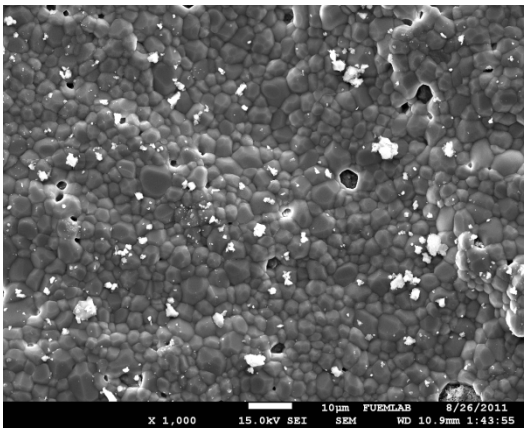
(b)

(B)

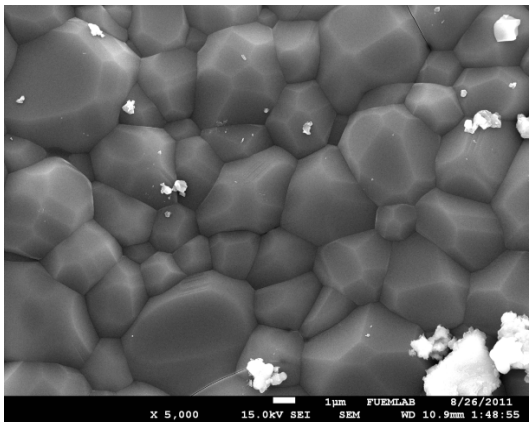
Şekil 4.42. H30Y10 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede (A) ve X3500 büyütmedeki (B) EDX spektrumları

Şekil 4.42' de %30 HA ve %10 yttria içerikli H30Y10 kodlu alternatif biyo-greftte genel olarak (Şekil 4.42(A)) ve yüzeyde oluşan aglomera parçalarının (Şekil 4.42(B)) EDX analiz spektrumları ve analiz alınan bölgelerin görüntüleri verilmektedir. Genel olarak ve aglomera parçasından alınan EDX analiz spektrumlarına göre numunede O, P, K, Na ve Ca elementlerinin bulunduğu ve yüzeydeki aglomera parçalarının apatit yapıları olduğu görülmektedir. Ayrıca genel olarak ve aglomera olan apatit yapılarından alınan EDX analiz sonuçları karşılaştırıldığında, aglomera olan apatit yapılarının daha düşük Ca, P ve Na elementi ve daha yüksek O elementi içerdiği görülmektedir.

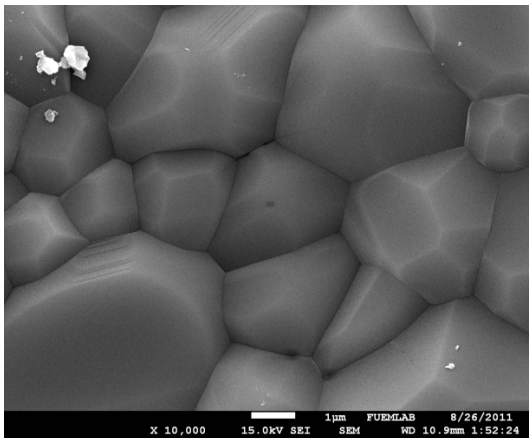
4.3.3. III Grup Biyo-Greftlerin (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) SEM Görüntüleri



(a)



(b)

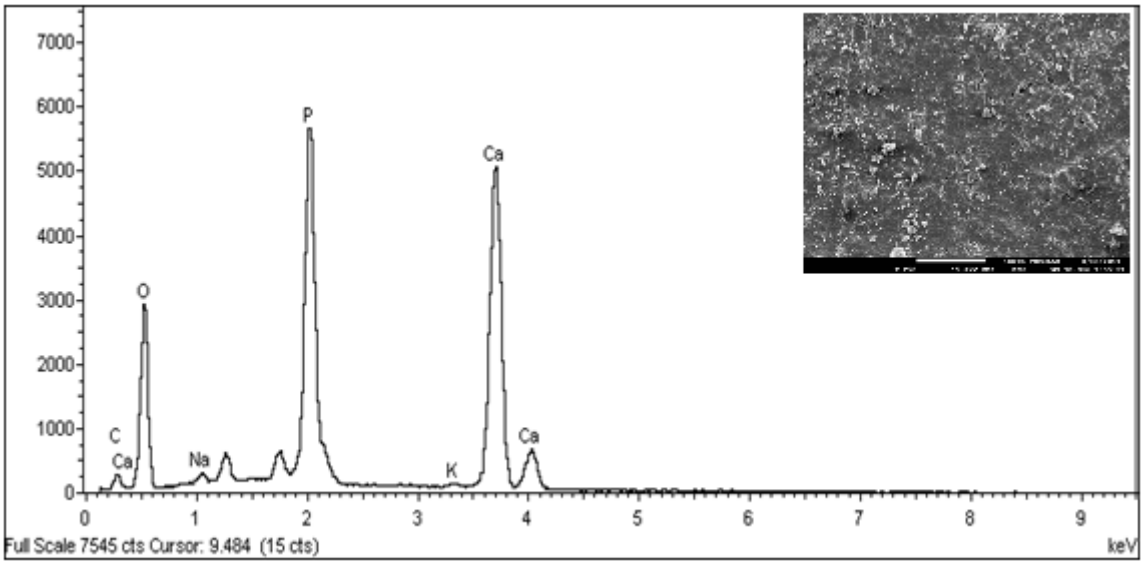


(c)

Şekil 4.43. N-H30S20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X1000, (b) X5000, (c) X 10 000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü.

Nano hidroksiapatit'in tane boyutlarının kemikte bulunan apatit minerallerine olan yakınlığından dolayı, nano hidroksiapatit ile yapılan araştırmalar giderek büyük önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, $CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli sübye kemiği gibi çeşitli doğal malzemelerden elde edilen tozlar eklenerek hidroksiapatitlerin kimyasal özellikleri, biyolojik uyumlulukları ve iç yapıları hakkında detaylı bilgiler verilmiştir.

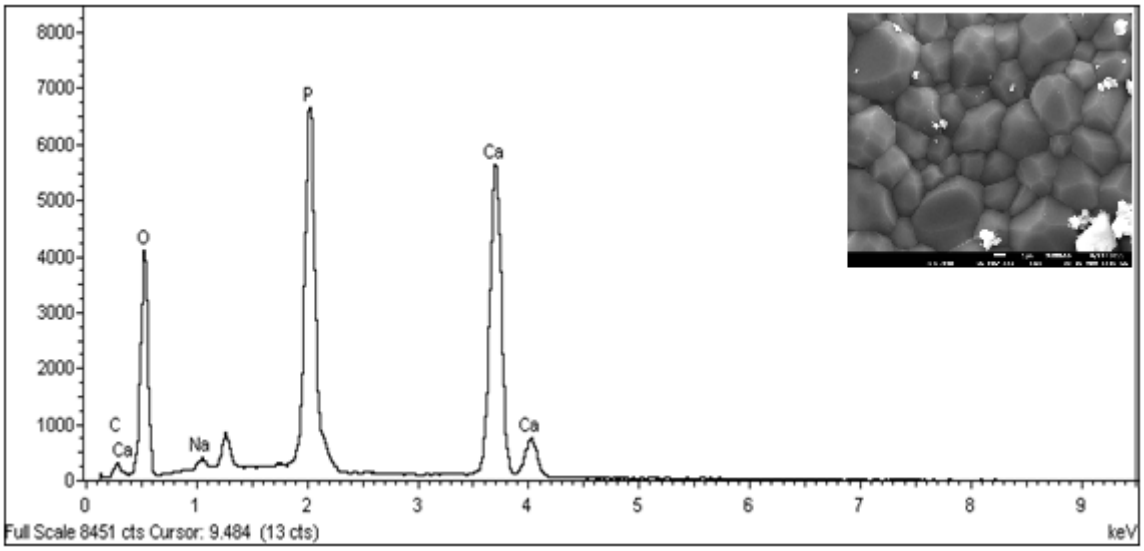
Yapılan çalışmada, HA esaslı alternatif biyo-greftlere (III. Grup) farklı oranlarda sübye kemiği tozu eklenerek elde edilen biyo-greftlerin kimyasal, fiziksel ve mekanik özelliklerine bakılarak farklı oranlarda katılan sübye kemik tozunun biyo-grefte sağladığı avantaj ve dezavantajlar incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, %30 nano boyutta HA esaslı ve %20 sübye kemiği (cuttle fish) tozu katkılı (N-H30S20 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerde çekilen SEM görüntüleri Şekil 4.43(a-c)'de verilmektedir. Görüntülere göre, N-H30S20 numunesinin en küçük büyütmesin de (X1000) yüzeyde katmanlı bir görüntünün oluştuğu, daha büyük büyütmelerde ise (Şekil 4.43(b-c)) üniform bir tane dağılımının oluştuğu ve bu taneler arasında aglomera olmuş apatit tanelerinin oluştuğu görülmektedir. Yüksek büyütmelerde farklı tane boyutlarına sahip (irili ufaklı) bir morfolojik yapı oluşmuştur. Ayrıca X1000 büyütmede yüzeydeki tane sınırlarında az miktarda boşlukların oluştuğu ve bu boşlukların etrafının beyaz olmasından dolayı sınırlara çökelen apatit tanelerinin üzerinde oluştuğu görülmektedir.



(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca
% Ağırlık	0.65	0.45	0.06	0.22	0.05	0.32
% Atomik Ağırlık	6.81	0.63	61.78	13.44	0.15	17.19

(b)
(A)



(a)

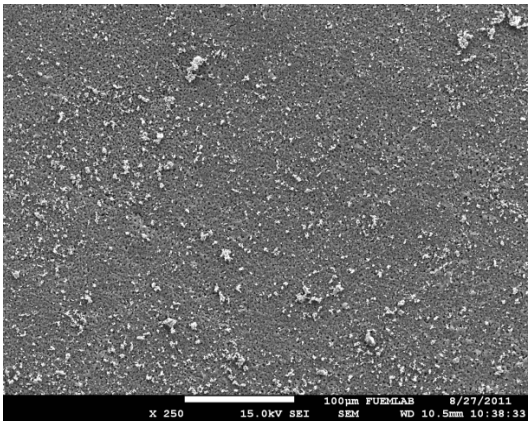
Element	C	O	Na	P	Ca
% Ağırlık (Sigma)	0.26	0.32	0.06	0.16	0.22
% Atomik Ağırlık	6.08	64.97	0.65	12.81	15.49

(b)

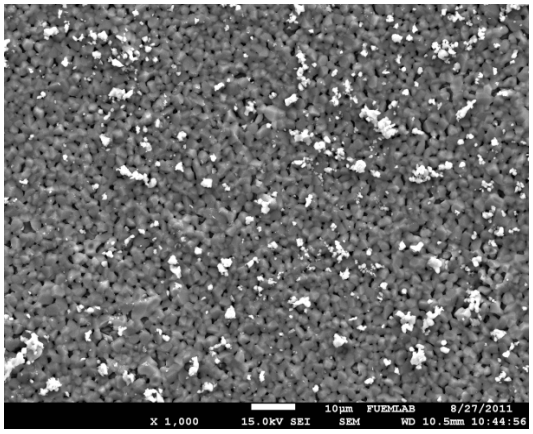
(B)

Şekil 4.44. N-H30S20 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak(A) ve apatit taneleri üzerinden (B) alınan EDX spektrumları

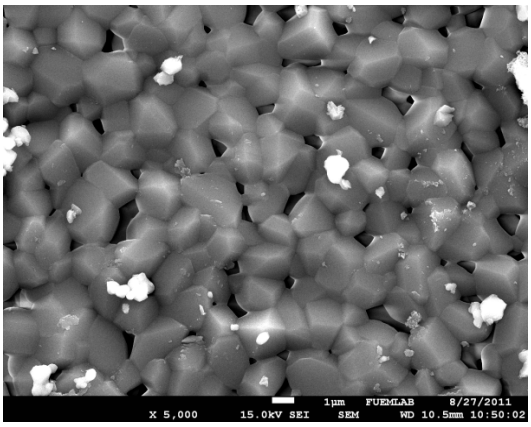
Nano boyutta HA esaslı ve %20 sübye kemiği tozu katkılı (N-H30S20 kodlu) alternatif biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak ve aglomera olmuş taneler üzerinden alınan EDX analiz sonuçları ve analizlerin alındığı bölgelerin SEM görüntüleri Şekil 4.44(A-B)'de verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre, N-H30S20 kodlu biyo-greft de Ca, P, K, Na, O ve C elementleri görülürken, C elementinin %ağırlık oranının yüzeyde oluşan apatit yapısında fazla olduğu görülmektedir.



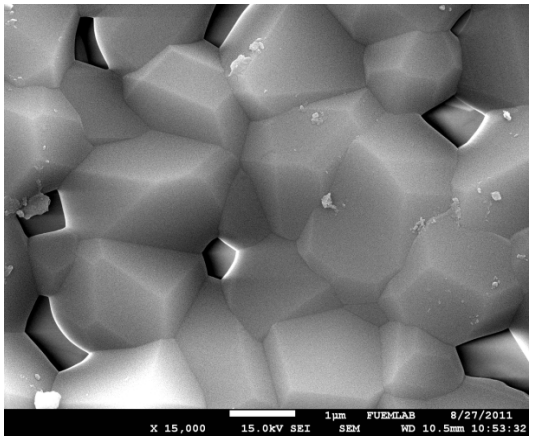
(a)



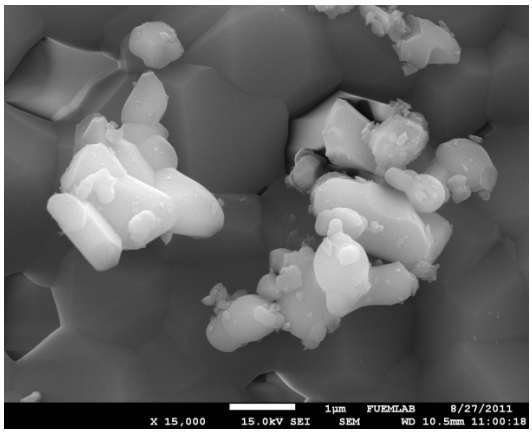
(b)



(c)



(d)



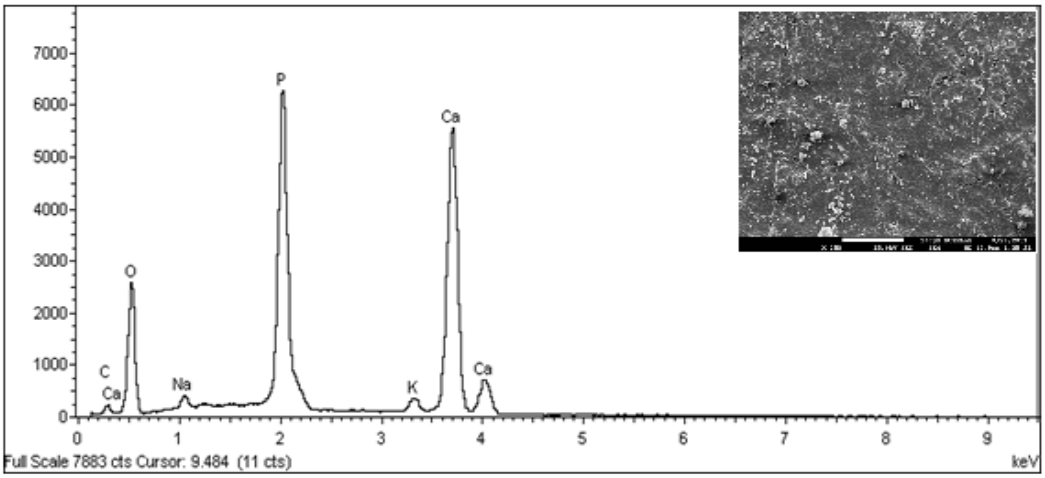
(c)

Şekil 4.45. N-H30S30 kodlu biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000, (d) X 15 000, (e) X15 000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

HA'nın kimyasal yapısı içerisinde Ca ve P elementleri bulunmaktadır. Bunlar kemik ve dişin inorganik kısmında bulunan elementlerdir. Kemik HA fazını içerdiğinden dolayı, vücudun yabancı malzemelere karşı gösterdiği tepkiler çok daha az olmakta ve genç kemik hücreleri HA yüzeyine yapışabilmekte ve çoğalabilmektedirler [202]. Ayrıca sentetik HA, doğal kemiğe göre mekanik yönden daha zayıftır, biyoaktivitesinde de farklılıklar vardır. Kemikte bulunan HA, sentetik HA'e göre biyolojik olarak daha aktiftir [202]. Nano tane boyutlarına sahip HA kemikte bulanan HA'e daha çok benzerlik göstermektedir.

Sentetik HA'nın zayıf yönlerini kuvvetlendirmek için son 20 yıl içerisinde pek çok çalışma yapılmıştır [2-6, 90]. Hem mekanik hem de biyolojik yönlerden gelişme sağlamak için, çalışmalar nano kristalli HA esaslı yumurta kabuğu ve sübye kemiği gibi doğal katkı malzemelerinden elde edilen bileşiklerle hazırlanan greftler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda, mekanik olarak öğütülen sübye kemiği tozlarından elde edilen greftlerden üretilen %30 nano boyutta HA esaslı ve %30 sübye kemiği tozu katkılı (N-H30S30 kodlu) alternatif biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.45(a-e)'de verilmektedir. Sübye kemiği tozundan elde edilen greftlerden alınan görüntülerden en iyi SEM görüntüsünü N-H30S30 kodlu biyo-greftin verdiği Şekil 4.45'de görülmektedir. Biyo-greftin üniform bir tane dağılımına sahip olduğu, tane sınırlarında oluşmuş bir poroz yapının olduğu ve yüzeyde yine üniform bir şekilde dağılan aglomera apatit tane yapısının oluştuğu Şekil 4.45(a-e)'de görülmektedir. N-H30S20 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında, daha düzenli bir tane, por ve apatit dağılımının oluştuğu gözlenmektedir.

Sinterlenen malzemelerin gözenekli yapısı eklenen katyon miktarı arttıkça artmaktadır. Eklenen katyon bileşikleri HA'in bozunmasını hızlandırır. Ca^{+2} iyonlarıyla eklenen katyonlar yer değiştirir ve HA in hegzagonal kafes parametrelerinde artışlar meydana gelir ve bu artışlar nedeniyle oluşan gerilimler HA'in bozunma hızını arttırır ve bozunma esnasında oluşan su molekülleri malzemenin yapısındaki gözeneklerin artmasına neden olur [202]. Bu nedenle III. grupta yapılan çalışmada, sübye kemiği tozunun %Ağırlık oranı arttıkça HA'in bozunması arttığı için gözeneklerin arttığı gözlenmektedir.

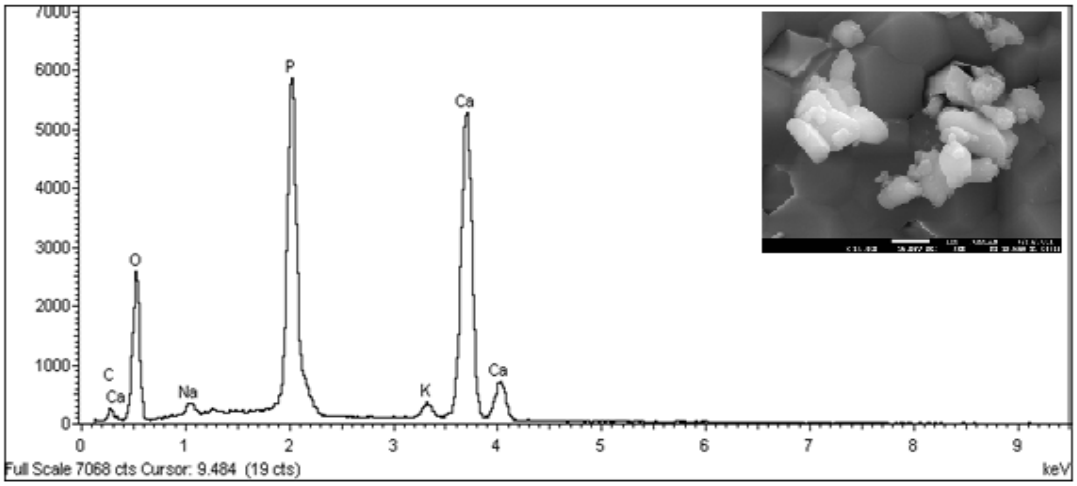


(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık	0.64	0.45	0.07	0.22	0.07	0.33
% Atomik Ağırlık	5.10	59.95	0.81	14.23	0.79	19.12

(b)

(A)



(a)

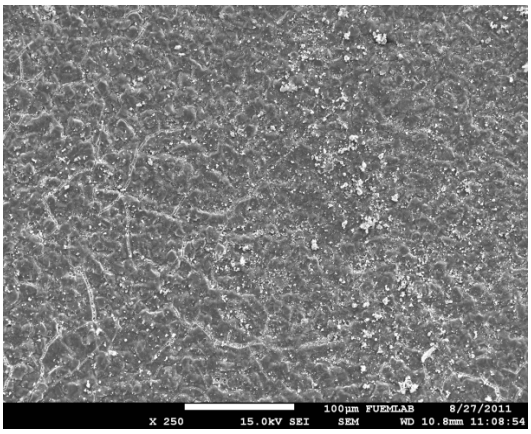
Element	C	O	Na	P	K	Ca
% Ağırlık	0.61	0.44	0.07	0.22	0.06	0.32
% Atomik Ağırlık	6.28	58.82	0.90	14.44	0.77	18.79

(b)

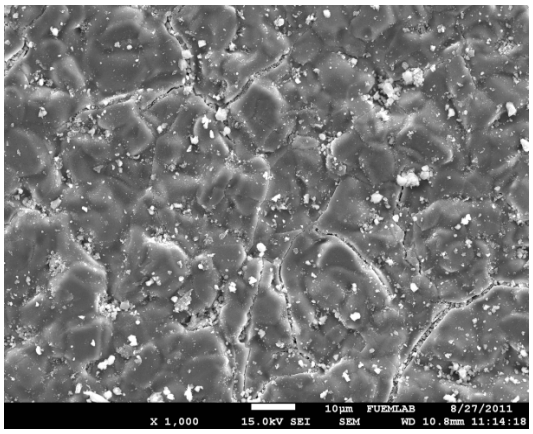
(B)

Şekil 4.46. N-H30S30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak(A) ve X15 000 büyütmede apatit tanesi üzerinden(B) alınan EDX spektrumları

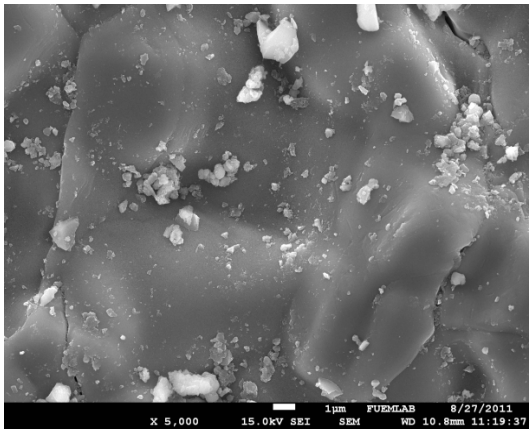
Şekil 4.46(A-B)'de %30 nano boyutta HA esaslı ve %30 sübye kemiği tozu katkılı (N-H30S30 kodlu) alternatif biyo-greftten genel olarak ve yüzeyde oluşan apatit tanelerinden alınan EDX analiz spektrumları verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre, yapıda C, O, Na, Ca, K elementlerinin bulunduğu görülürken, yüzeyden genel olarak alınan EDX sonucu ile apatitten alınan %Ağırlık sonuçları arasında pek bir fark oluşmadığı Şekil 4.46 (A-B)'de görülmektedir. N-H30S20 kodlu biyo-greft ile karşılaştırıldığında ise, Şekil 4.46'da verilen EDX analiz sonuçlarıda yüzeyde oluşan düşük C ve O içeriğiyle HA in bozunma oranının artması SEM görüntüleriyle (Şekil 4.46.) desteklenmektedir.



(a)



(b)



(c)

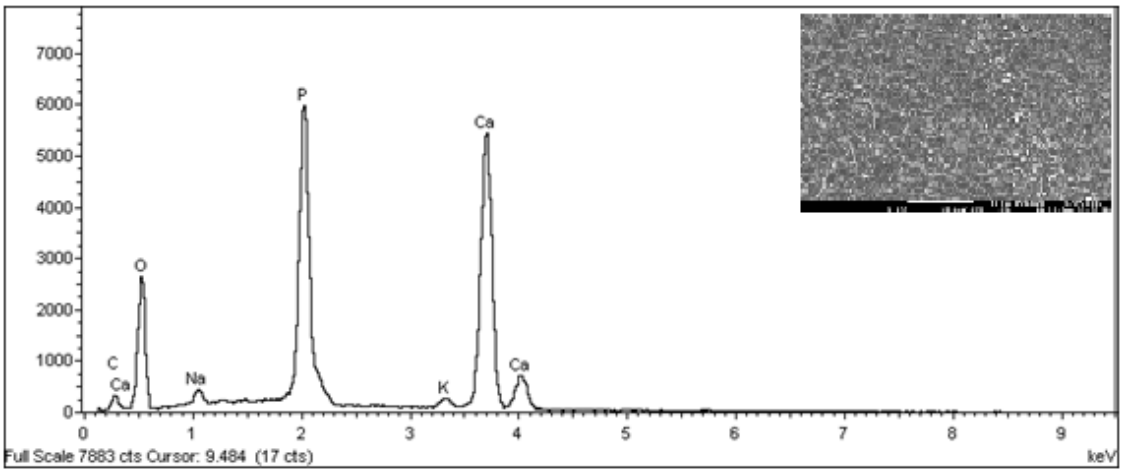
Şekil 4.47. N-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü.

Sol-jel yöntemiyle üretilen %30 nano boyutta HA esaslı ve %40 sübye kemiği tozu katkılı (N-H30S40 kodlu) alternatif biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.47 (a-c)'de verilmektedir. SEM görüntülerine göre, N-H30S40 kodlu biyo-greftde sıvı faz sinterlenmesinden dolayı tane sınırlarının belirgin olmadığı (Şekil 4.47(a)) ve nano boyutta HA kullanıldığı için

yüzeyde aglomera apatit tanelerinin oluştuğu (Şekil 4.47(b-c)) görülmektedir. Ayrıca N-H30S40 kodlu biyo-greftin yüzeyinde tane sınırlarında yüzey çatlaklarının oluştuğu (Şekil 4.47(a)) gözlenmektedir. Buna bağlı olarak nano boyutta HA esaslı ve %20-30 oranlarında sübye kemiği içerikli biyo-greftlerle kıyaslandığında, en kötü SEM görüntüsünün %40 sübye kemiği katkılı biyo-greftte elde edildiği gözlenmektedir. Bunun yanında, X5000'lik en büyük büyütmede N-H30S20 ve N-H30S30 kodlu numunenin mikroskop görüntüsüne göre tane sınırlarının görülmediği ve N-H30S40 kodlu numunenin yüzeyinde çatlak oluşan tek numune olduğu ve apatit boyutları en küçük olan numune olduğu da tespit edilmektedir.

Element	C	O	Na	P	K	Ca
% Ağırlık (Sigma)	0.65	0.45	0.07	0.22	0.06	0.32
% Atomik Ağırlık	8.85	58.18	1.01	13.55	0.53	17.88

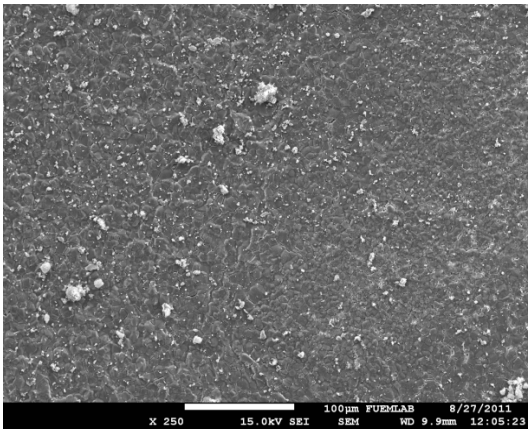
(a)



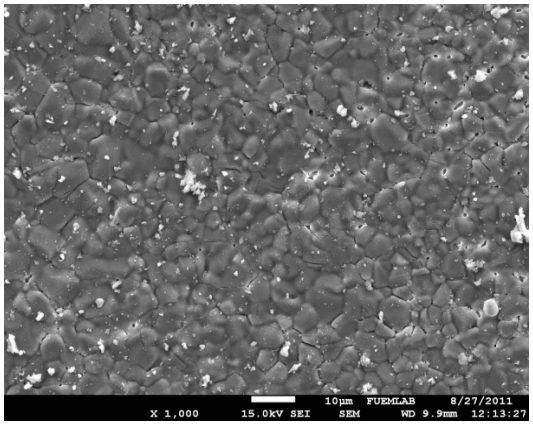
(b)

Şekil 4.48. N-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmedeki EDX spektrumu

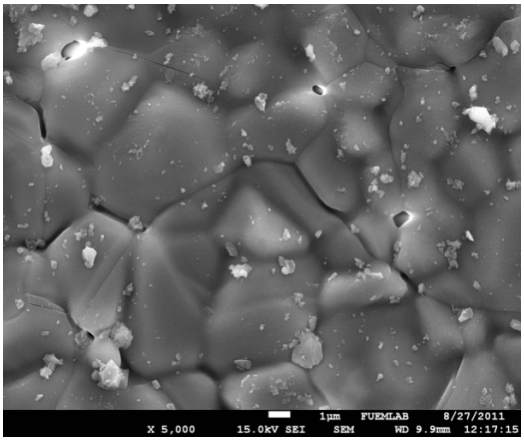
Şekil 4.48 (a-b)'de %30 nano boyutta HA esaslı ve %40 sübye kemiği katkılı (N-H30S40 kodlu) alternatif biyo-greftten genel olarak alınan EDX analiz spektrumu ve analizin alındığı bölgenin SEM görüntüleri verilmektedir. Analiz sonucuna göre N-H30S40 kodlu biyo-greft düşük miktarlarda C ve Na elementleri içerdiği ve yüksek miktarlarda da Ca, P ve O elementlerini içerdiği gözlenmektedir.



(a)



(b)

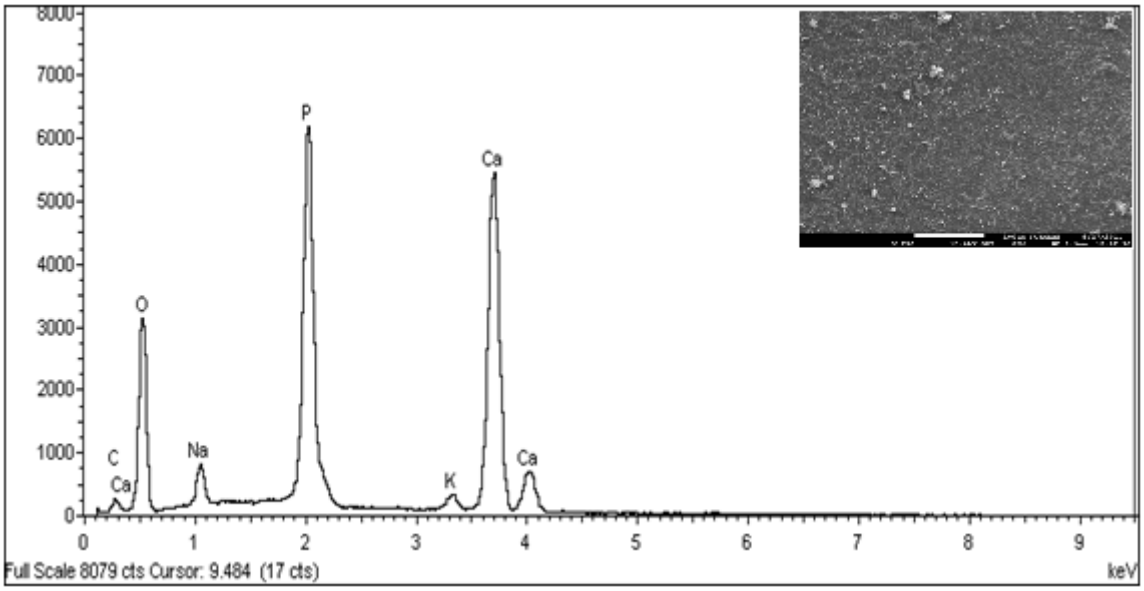


(c)

Şekil 4.49. M-H30S20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Kemik kimyasal olarak kalsiyum fosfat tuzları, organik bileşikler ve sudan ve makroskopik olarak da kortikal (sıkı yapılı) ve trabeküler (süngersi) kemikten oluşmaktadır. Kortikal (sıkı yapılı) kemiğin ağırlıkça %69'unu kalsiyum fosfat mineraller, % 22'sini organikler ve % 9'unu da su oluşturmaktadır [202]. Sıkı kemik dokusu haversian kanalları denilen küçük gözeneklerden, Volkman kanalları, laküna ve kanaliküli diye adlandırılan yapılardan oluşur [202]. Kemiğin mineral kısmı çeşitli iyonlar (Na^+, Mg^{2+} , K+, CO_3^{2-} , Cl^-, F^-) da içeren HA'dan meydana gelir. Bu bilgiler doğrultusunda, %30 HA esaslı ve $CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli sübye kemiği (Ağırlıkça %20 oranında) katkılı alternatif biyo-greftler üzerinde sübye kemiğinin etkisini incelemek amacıyla üretilen M-H30S20 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsü Şekil 4.49(a-c) de verilmektedir. SEM görüntülerinden, üniform bir tane dağılımının ve aglomera apatit yapısının oluştuğu görülürken, tane sınırlarında boşluklu (poroz) yapının oluştuğu ve bu porozların yüzeydeki çatlakların başlangıç noktaları olduğu gözlenmektedir. Ayrıca Şekil 4.49(c)'de gösterilen poroz yapıların etrafındaki beyaz görüntüler apatit tanelerine ait olup, bu apatit tanelerinin üzerinde poroz yapı

oluşmaktadır. N-H30S20 ile M-H30S20 kodlu biyo-greftler kıyaslandığında, nano boyutta HA tozu kullanılarak üretilen N-H30S20 kodlu biyo-greftin daha düzenli bir tane yapısına sahip olduğu ve her iki biyo-greftte porların tane sınırlarında oluştuğu, fakat N-H30S20 kodlu biyo-greftte por boyutlarının daha büyük olduğu tespit edilmektedir.

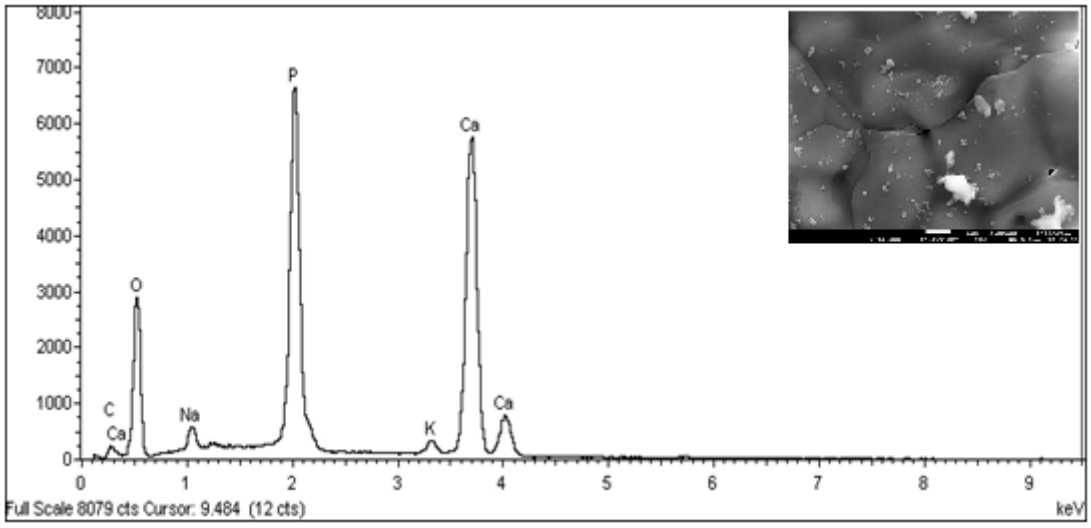


(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca
% Ağırlık	0.60	0.43	0.08	0.20	0.06	0.29
% Atomik Ağırlık	5.53	61.17	2.14	13.47	0.64	17.05

(b)

(A)



(a)

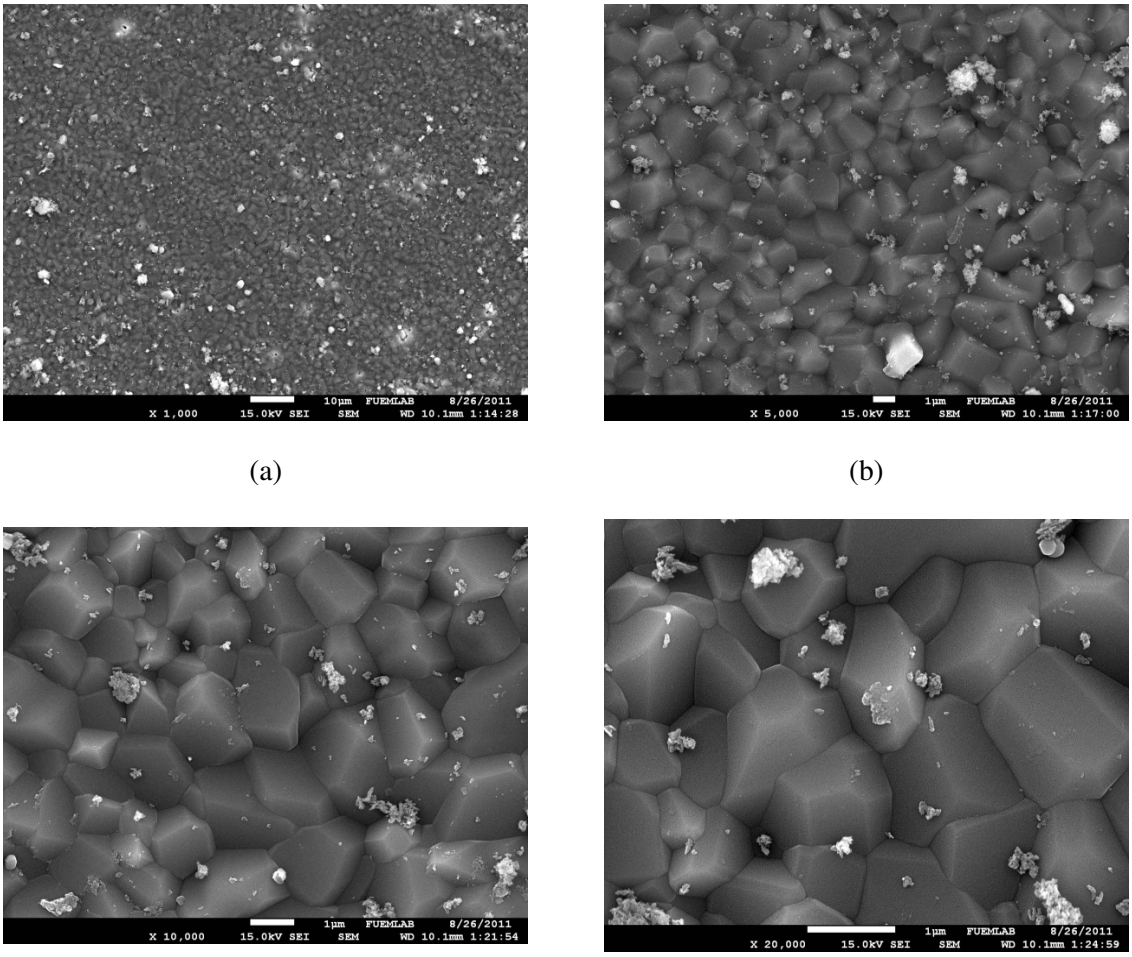
Element	C	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık	0.58	0.41	0.07	0.21	0.06	0.30
% Atomik Ağırlık	5.45	59.44	1.41	14.63	0.65	18.42

(b)

(B)

Şekil 4.50. M-H30S20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 (A) ve X10 000 (B) büyütmedeki EDX spektrumları.

Şekil 4.50 (A-B)'de %30 mikron boyutta HA esaslı ve %20 sübye kemiği katkılı M-H30S20 kodlu alternatif biyo-greftten X250 büyütmede genel olarak ve yüzeyde oluşan apatit yapısından alınan EDX analiz sonuçları ve analizin alındığı bölgenin SEM görüntüleri gösterilmektedir. Genel olarak ve yüzeyde oluşan apatit yapısından alınan analiz sonuçlarına göre, yapılarda Ca, P, K, Na, O, C iyonlarının bulunduğu görülürken, yüzeydeki apatit tanelerinde C, Na ve K iyonlarının içeriğinin düşük Ca iyonunun içeriğinin yüksek olduğu Şekil 4.50 (A-B)'de görülmektedir.

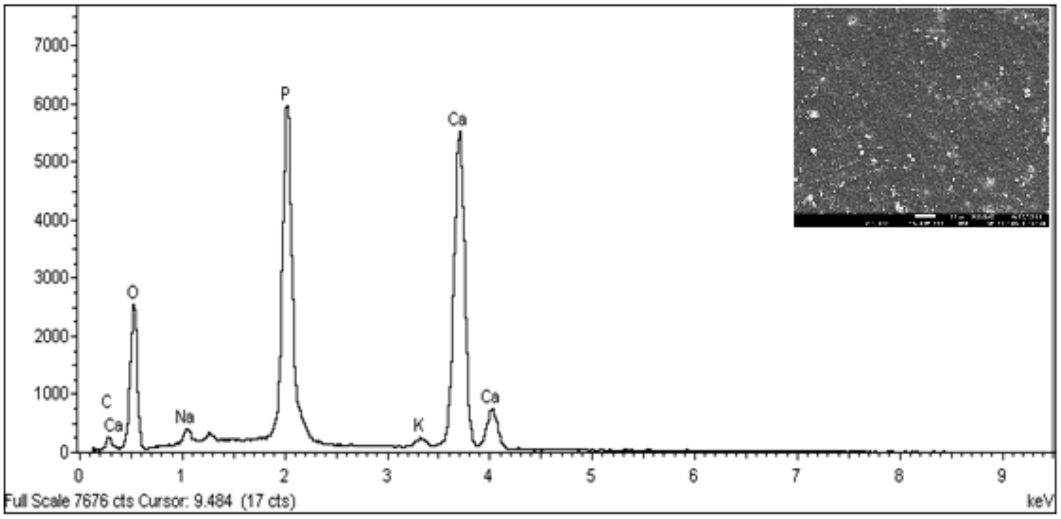


(a) (b)

(c) (d)

Şekil 4.51. M-H30S30 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X1000, (b) X5000, (c) X10 000, (d) X20 000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

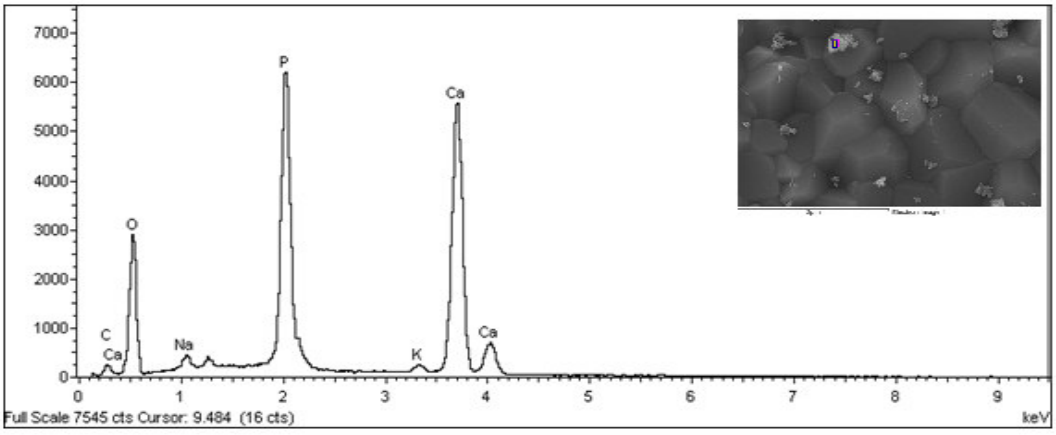
Tek yönlü izostatik preslenip, 1250 °C de sinterlenen %30 mikron boyutta HA esaslı ve %30 sübye kemiği katkılı (M-H30S30 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.51 (a-d)'de verilmiştir. Şekil 4.51 (a-d)'de, M-H30S30 kodlu biyo-greftte sıvı faz sinterlemesine bağlı düzenli bir tane dağılımı (Şekil 4.51 (a)) ve yüzeyde küçük aglomera apatit tanelerinin oluştuğu (Şekil 4.51(a-d)) görülmektedir. M-H30S20 kodlu biyo-greft M-H30S30 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında, M-H30S30 kodlu biyogreftin daha üniform bir tane dağılımına sahip olduğu ve yüzeyde oluşan aglomera apatit oranının daha yüksek olduğu gözlenirken, M-H30S30 kodlu biyo-greftin yüzeyinde hiç çatlak oluşmadığı ve sinterlemede tam yoğunluk sağlandığı tespit edilmiştir(Şekil 4.51(a)). N-H30S30 kodlu biyo-greftle M-H30S30 kodlu biyo-greft kıyaslandığında ise, M-H30S30 kodlu biyo-greftte tane sınırlarında boşlukların oluşmadığı ve tane sınırlarının belirginliğinin daha düşük olduğu görülmektedir.



(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca
% Ağırlık	0.61	0.44	0.06	0.22	0.06	0.32
% Atomik Ağırlık	7.31	58.39	0.89	14.17	0.42	18.82

(b)
(A)



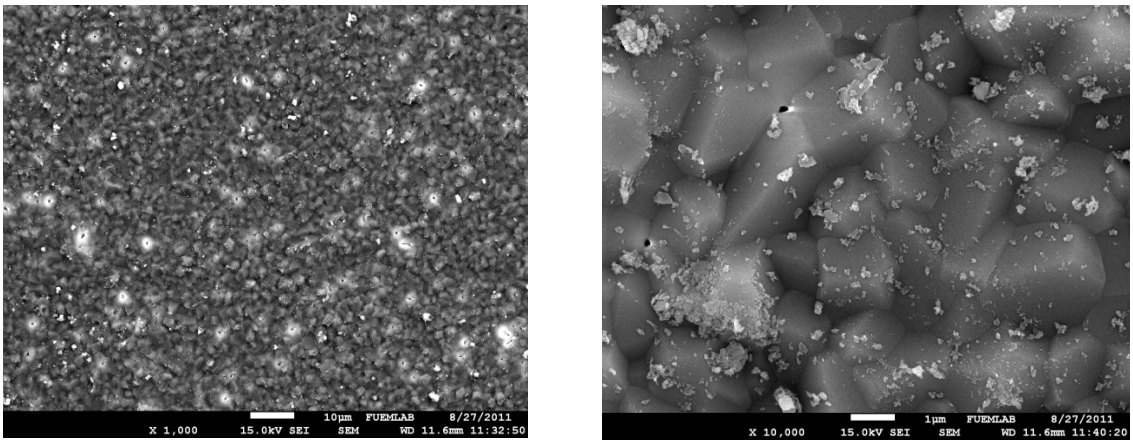
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık (Sigma)	0.60	0.43	0.07	0.21	0.06	0.31
%Atomik Ağırlık	6.27	60.49	0.93	13.95	0.40	17.96

(b)
(B)

Şekil 4.52. M-H30S30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 (A) ve X20 000 (B) büyütmelerdeki EDX spektrumları

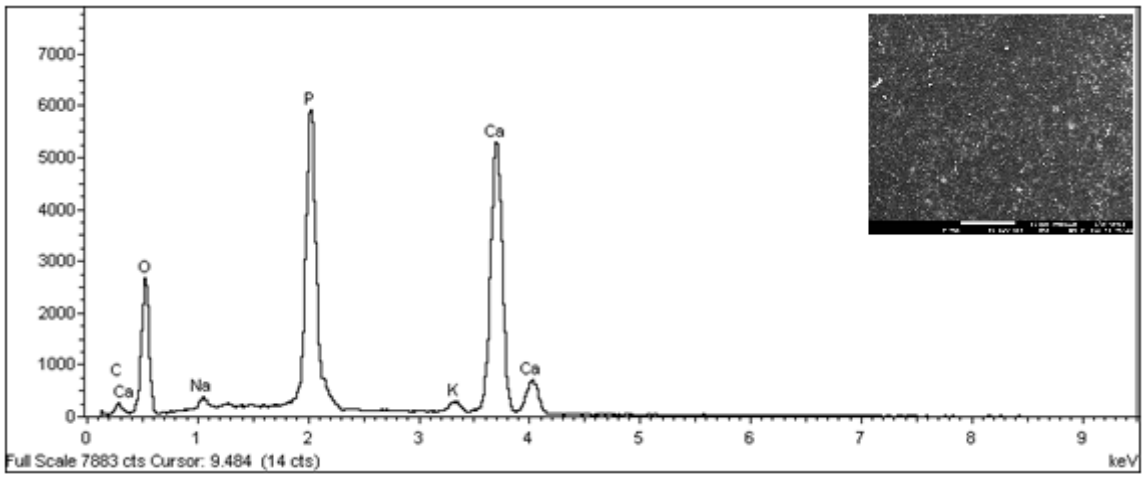
Şekil 4.52(A-B)'de %30 mikron boyutta HA esaslı ve %30 sübye kemiği katkılı (M-H30S30 kodlu) alternatif biyo-greftin yüzeyinden X250 büyütmede genel olarak alınan ve X 20 000 büyütmede tane sınırlarında oluşan apatit tanelerinden alınan EDX analiz sonuçları ve analiz alınan bölgelerin SEM görüntüleri verilmektedir. EDX analiz sonuçlarına göre, X250 büyütmede yapıda Ca, K, P, Na, O ve C iyonları görülürken, yüzeyde oluşan apatit tanelerinde % ağırlık oranı düşük Ca ve C iyonları ve yüksek O iyonlarına sahip bir yapının oluştuğu görülmektedir.



(a) (b)

Şekil 4.53. M-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X1000, (b) X10 000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

$CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli sübye kemiğinin biyo-greftler üzerinde etkisini görmek amacıyla üretilen ağırlıkça %30 oranında HA esaslı ve %40 sübye kemiği katkılı biyo-greftin (M-H30S40 kodlu) farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.53 (a-b)'de verilmektedir. Şekil 4.53(a-b)'de üniform bir tane dağılımın oluştuğu, yüzeyde oluşan apatit oranının düşük, boyutlarının küçük ve düzenli bir yapıda olduğu gözlenirken, tane sınırlarında oluşan apatit yapılarının üzerinde poroz yapıların oluştuğu belirlenmiştir. M-H30S20 ve M-H30S30 kodlu biyo-greftler ile kıyaslandığında, M-H30S40 kodlu iyo-greftin M-H30S20 ve M-H30S30 kodlu biyo-greftlere göre yüzeyinde hiç çatlak oluşmadığı ve porozitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.53(a-b)). Ayrıca M-H30S40 kodlu biyo-greftte kısmi sıvı faz sinterlemesi oluştuğundan dolayı, tane sınırları M-H30S30 kodlu biyo-grefte göre daha az N-H30S40 kodlu biyo-grefte göre de daha fazla belirgin olduğu Şekil 4.53(a-b)'de görülmektedir.



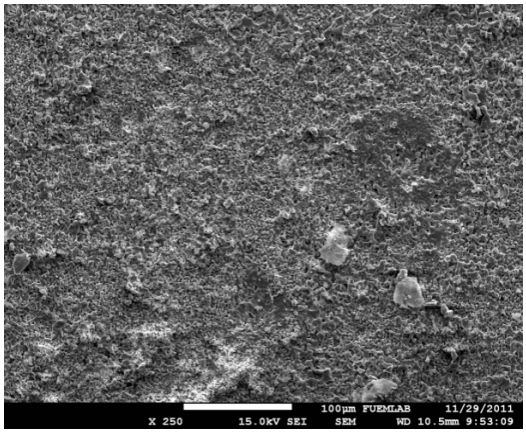
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık	0.64	0.45	0.06	0.22	0.06	0.32
%Atomik Ağırlık	6.04	60.19	0.75	14.09	0.59	18.34

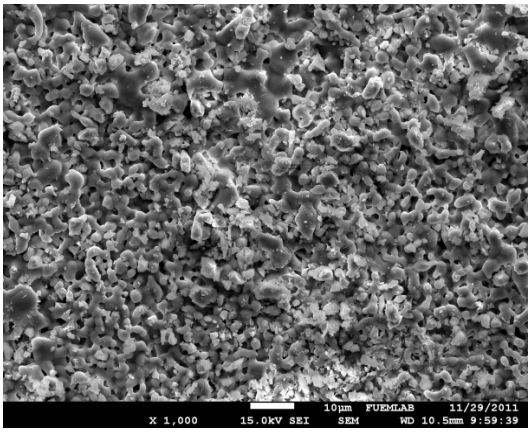
(b)

Şekil 4.54. M-H30S40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmeden alınan EDX spektrumu.

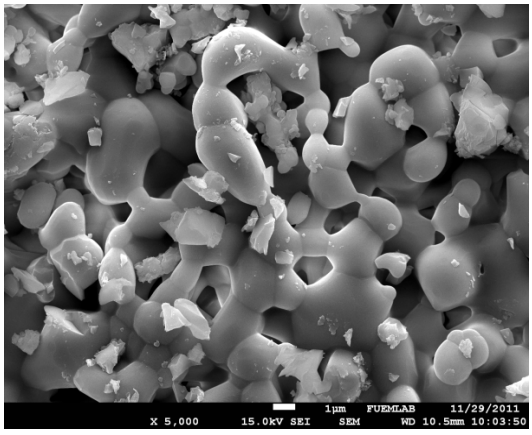
Şekil 4.54(a-b)'de M-H30S40 kodlu biyo-greftten X250 büyütmede genel olarak alınan EDX analiz sonuçları verilmekte olup, yapıda Ca, P, K, Na, O iyonlarının bulunduğu ve bu iyonlara bağlı olarak yapıda CO_3, PO_4 içerikli apatit bileşiklerinin oluştuğu görülmektedir.



(a)



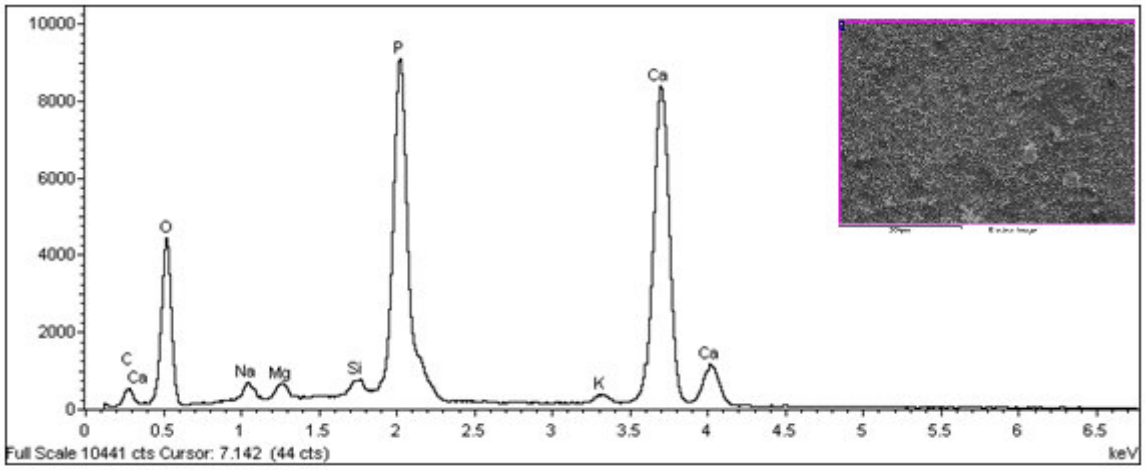
(b)



(c)

Şekil 4.55. M-H30L20 kodlu biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Yapılan çalışmada, lületaşı tozunun kemik defekti onarımında yeni bir greft malzemesi olarak kullanılabilirliği ve biyomekanik ve histopatolojik etkinliğini saptamak amacıyla HA tozuna belirli oranlarda ilave edilerek hem lületaşının hem de lületaşı miktarındaki farklılıkların greft üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla sol-jel yöntemiyle mikron ve nano boyuttaki HA tozuna %20-40 oranlarında lületaşı tozu ilave edilerek greftler üretilip, 1250 ºC de sinterlenmiştir. Şekil 4.55 (a-c)'de ağırlıkça %30 oranında mikron boyutta HA esaslı ve %20 oranında lületaşı katkılı (M-H30L20 kodlu) biyo-greftlerin sinterleme sonrası farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.55 (a-c)'de M-H30L20 kodlu biyo-greftin tam olarak sinterlenebildiği görülürken, tane şekillerinin ve tane dağılımının düzensiz olduğu ve tane sınırlarında makroporoz yapının oluştuğu Şekil 4.55 (b-c)'den görülebilmektedir.



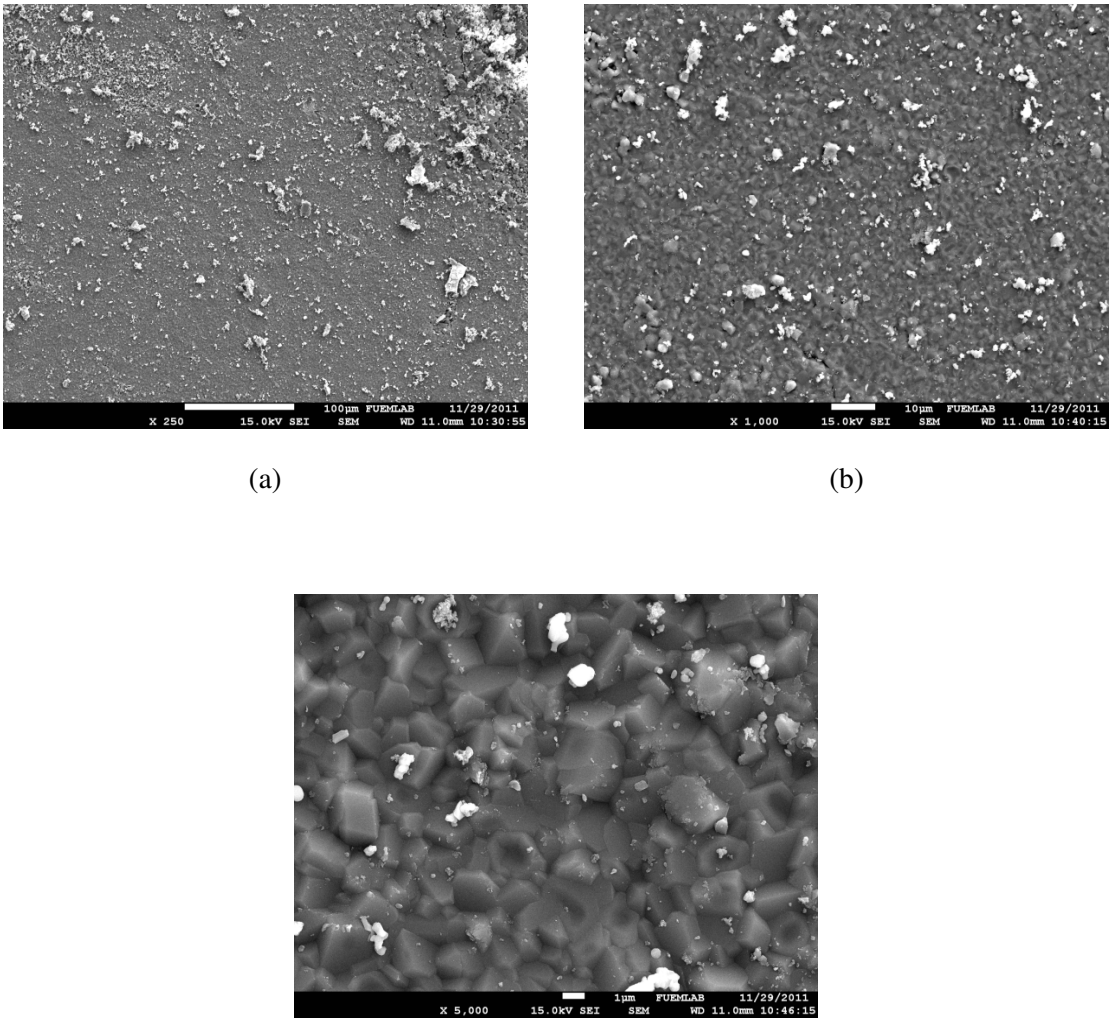
(a)

Element	C	O	Na	P	Mg	K	Si	Ca
%Ağırlık	4.58	42.33	1.00	18.05	0.74	0.05	0.74	31.91
%Atomik Ağırlık	8.44	58.50	0.96	12.89	0.67	0.42	0.52	17.60

(b)

Şekil 4.56. M-H30L20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmeden alınan EDX spektrumu

Şekil 4.56 (a-b)'de ağırlıkça %30 oranında mikron boyutta HA esaslı ve %20 oranında lületaşı katkılı (M-H30L20 kodlu) alternatif biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak alınan EDX analiz spektrumu verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre yapıda HA, KH_2PO_4 bileşiğine bağlı olarak Ca, O, K ve P elementleri görülürken, lületaşı tozuna bağlı olarakta Ca, C, Mg, Si ve O iyonlarının bulunduğu görülmektedir. Biyo-greftte O, P ve Ca iyon miktarının yüksek, C, Na, Mg, K ve Si iyon miktarının düşük olduğu da Şekil 4.56 (a-b)'den tespit edilmektedir.



(a) (b)

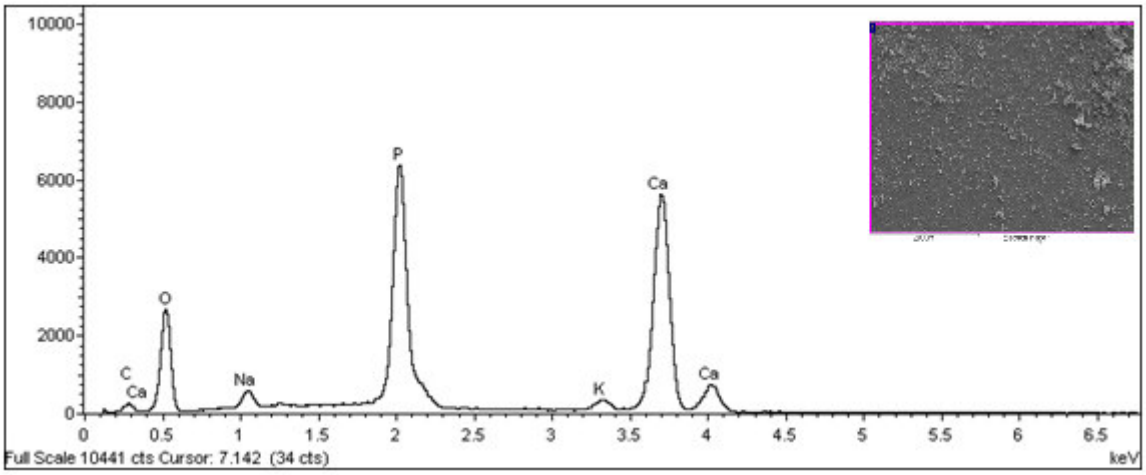
(c)

Şekil 4.57. M-H30L30 kodlu alternatif biyo-greftin(a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Lületaşının, düzensiz kristal dağılımının yanında çok ince, gözenekli ve yumuşak bir dokuya sahip olduğu $Mg_4Si_6O_{15}(OH)_2$ $6H_2O$ kimyasal formülüyle ifade edilmektedir. Ayrıca lületaşı gözenekli bir yapıda olup mikropor çapı 15Å'dur. Lületaşı kendine özgü yapısı ile yüksek absorbsiyon ve adsorbsiyon özelliğine sahiptir. Geniş yüzey alanı, lifsi, gözenekli yapısı ve fizikokimyasal aktiviteler gibi özelliklerinden dolayı kendi ağırlığının 200-250 katı kadar su tutabilmektedir. Genleşme özelliğine sahip olmayan lületaşı 300ºC'nin üstündeki sıcaklıklara ısıtıldığında yapısal değişikliklere ve gözeneklerin tahrip olmasına bağlı olarak absorbsiyon özelliği azalmaktadır [203,204].

Sol-jel yöntemiyle üretilen %30 mikron boyutta HA esaslı ve %30 lületaşı tozu katkılı (M-H30L30 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.57 (a-c) de verilmektedir. Şekil 4.57(a-c)'ye göre, M-H30L30 kodlu biyo-greftin sıvı faz sinterlemesine bağlı olarak homojen ve yoğun bir densifikasyona sahip yapı gösterdiği ve tane sınırlarının tam belirgin

olmadığı görülürken, M-H30L20 kodlu biyo-grefte görülen poroz yapının M-H30L30 kodlu biyo-greftte oluşmadığı gözlenmektedir. Buda lületaşı oranının artmasıyla densifikasyonun ve sinterlenebilirliğin arttığını göstermektedir. Yüzeyde oluşan homojen dağılımın yanında yine tane sınırlarında homojen bir şekilde dağılan apatit tanelerinin oluştuğu ve bu tanelerin kendi içinde aglomera olduğu gözlemlenmiştir.



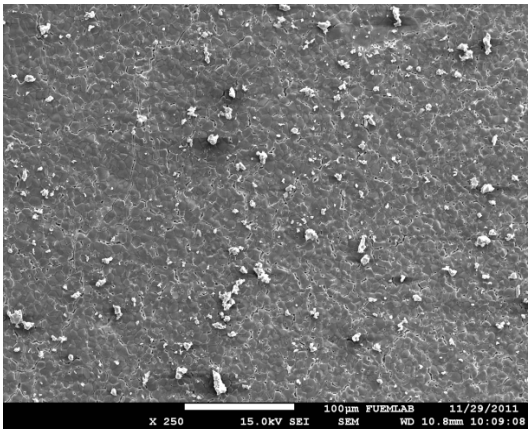
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık	3.11	41.59	1.56	19.60	1.27	32.87
%Atomik Ağırlık	5.87	58.92	1.53	14.35	0.74	18.59

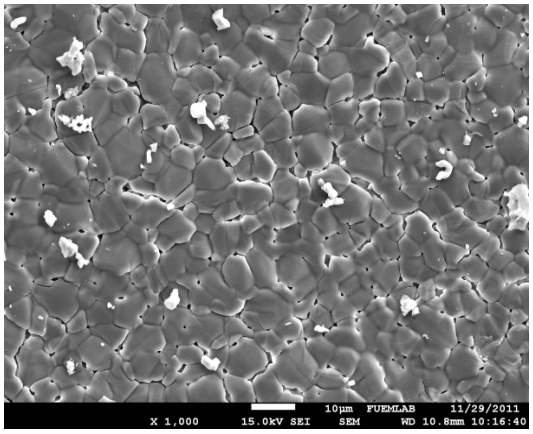
(b)

Şekil 4.58. M-H30L30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

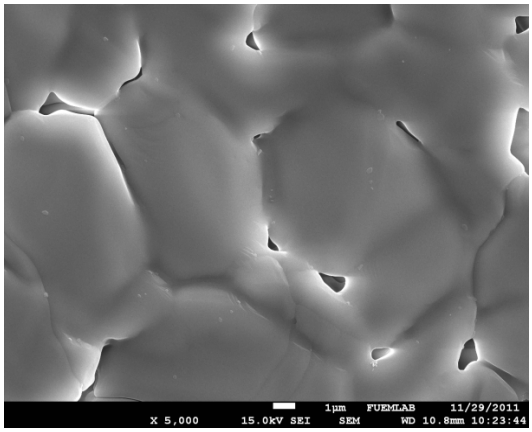
Şekil 4.58(a-b) %30 mikron boyutta HA esaslı ve %30 lületaşı tozu katkılı (M-H30L30 kodlu) alternatif biyo-greftin X250 büyütmeden genel olarak alınan EDX analiz sonuçları verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre biyo-greft malzemesinin içeriğindeki HA ve lületaşına bağlı olarak yoğun miktarda Ca, O ve P görülürken eser miktarda da C, Na ve K görülmektedir.



(a)



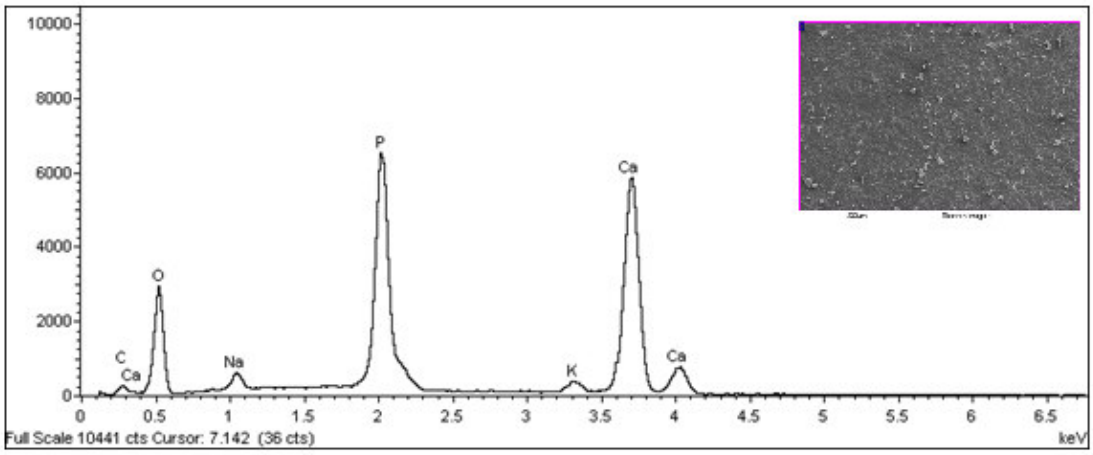
(b)



(c)

Şekil 4.59. M-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Mikron boyutta HA esaslı ve %40 lületaşı katkılı (M-H30L40 kodlu) alternatif biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.59 (a-c)'de verilmektedir. Şekil 4.59'a göre, yapıda karmaşık bir partikül dağılımının oluştuğu, tane sınırlarında M-H30L30 kodlu biyo-greftin aksine gözenekli yapının oluştuğu ve bu yapının tane sınırları boyunca büyüdüğü görülmektedir. Ayrıca tane sınırlarına çökelmiş apatit tanelerinin oluştuğu da Şekil 4.59'da gözlenmektedir. M-H30L30 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında, lületaşı oranı arttıkça düzenli yapının oluştuğu, densifikasyonun arttığı ve tane sınırlarındaki gözenekli yapının azaldığı belirlenmektedir.



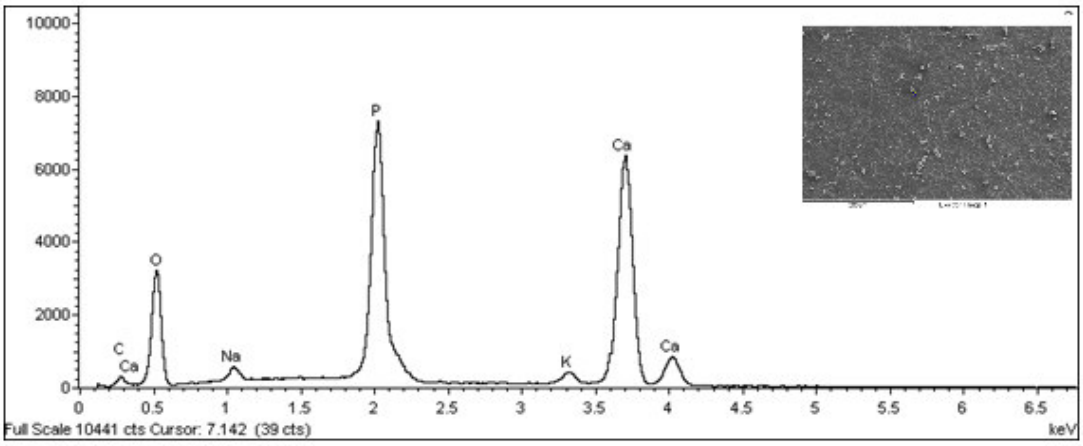
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık	2.57	42.02	1.54	19.48	1.36	33.03
%Atomik Ağırlık	4.87	59.76	1.52	14.31	0.79	18.75

(b)

Şekil 4.60. M-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

Şekil 4.60 (a-b) %30 mikron boyutta HA esaslı ve %40 lületaşı katkılı (M-H30L40 kodlu) alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX analiz spektrumunu vermektedir. Analiz sonuçlarına göre M-H30L40 kodlu biyo-greft malzemesinde, HA'e bağlı olarak yoğun miktarda Ca, O ve P iyonları görülürken, lületaşı, $NaCO_3$ ve KH_2PO_4 bileşiklerine bağlı olarak da az miktarda C, Na ve K iyonları gözlenmektedir.



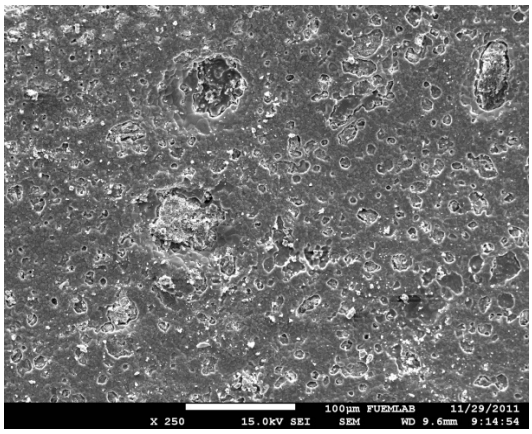
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca
%Ağırlık	3.07	42.68	1.10	19.36	1.43	32.36
%Atomik Ağırlık	5.76	60.08	1.08	14.07	0.82	18.19

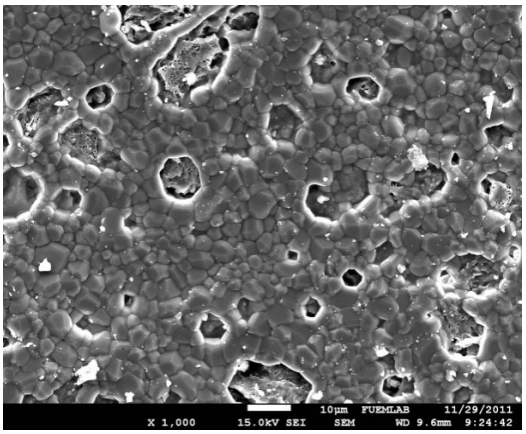
(b)

Şekil 4.61. M-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede apatit tanesi üzerinden alınan EDX spektrumu

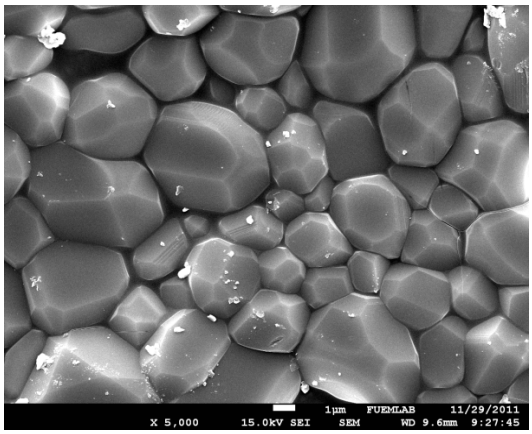
Şekil 4.61'de %30 mikron boyutta HA esaslı ve %40 lületaşı katkılı (M-H30L40 kodlu) biyo-greftin tane sınırlarında oluşan apatit tanelerinden alınan EDX analiz sonuçları verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre, HA esaslı ve $CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli lületaşı katkılı biyo-grefte yoğun miktarda Ca, O ve P iyonlarının ve düşük miktarda da C, Na ve K iyonlarının bulunduğu görülmektedir.



(a)



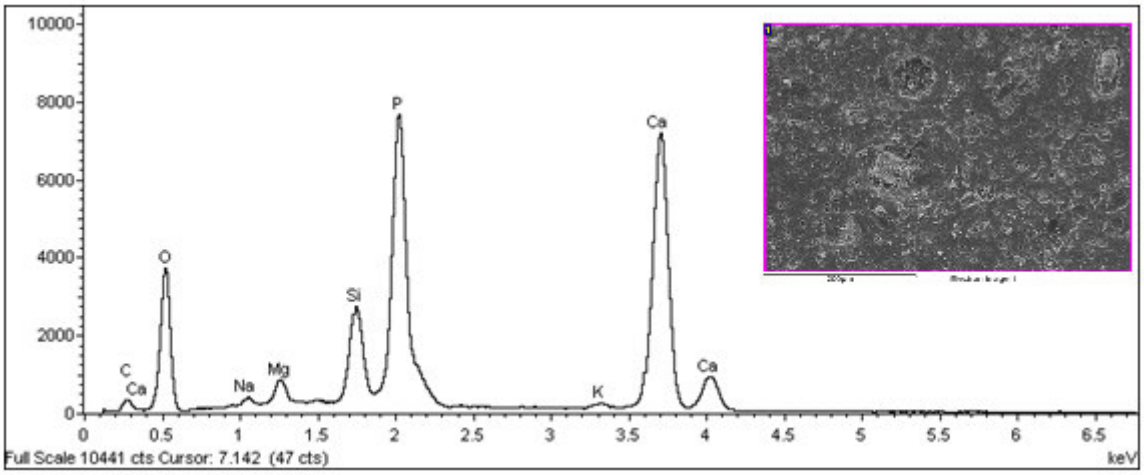
(b)



(c)

Şekil 4.62. N-H30L20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Nano boyutta HA esaslı ve %20 lületaşı katkılı (N-H30L20 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.62'de vermektedir. SEM görüntülerinden, tanelerin homojen bir şekilde dağıldığı, tane sınırlarının belirgin olduğu, 1250ºC sinterleme sıcaklığına çıkılmasına rağmen tam bir densifikasyonun ve sıvı faz sinterlemesinin oluşmadığı ve yüzeyden çok derine inmeyen por yapılarının oluştuğu görülmektedir.



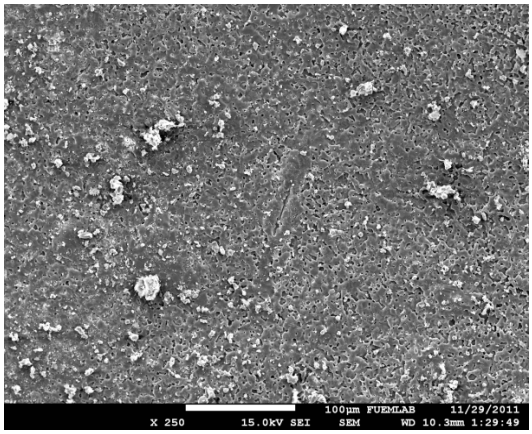
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca	Mg	Si
%Ağırlık	4.27	40.66	0.46	17.68	0.46	30.69	1.24	4.55
%Atomik Ağırlık	7.93	56.76	0.44	12.75	0.26	17.10	1.14	3.62

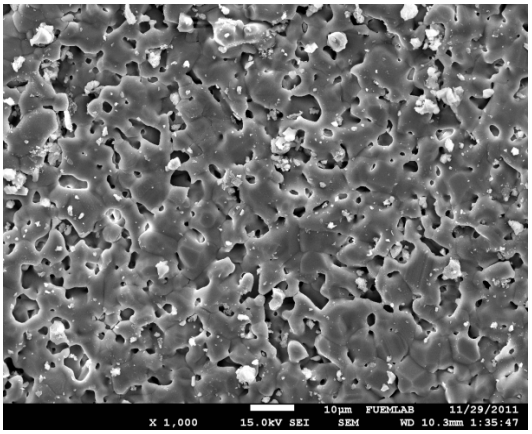
(b)

Şekil 4.63. N-H30L20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

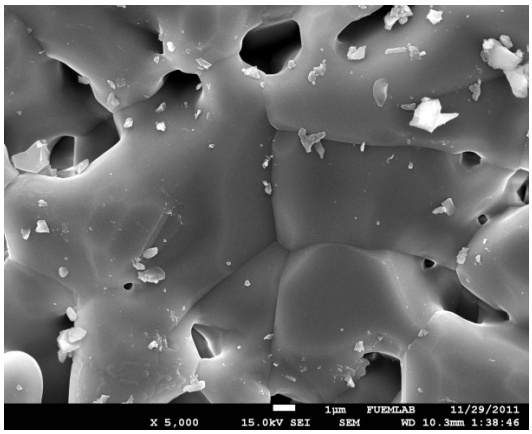
HA'in kimyasal yapısı içerisinde Ca, O ve P elementleri bulunmaktadır. Bunlar kemik ve dişin inorganik kısmında bulunan elementler olup, kemik kompozisyonunda aynı elementleri içerdiğinden, vücudun yabancı malzemelere karşı gösterdiği tepkiler çok düşük olmakta ve genç kemik hücreleri HA yüzeyine yapışabilmekte ve çoğalabilmektedir. Hatta HA'in yüksek biyoaktivitesi sayesinde kemikle malzeme ara yüzeyinde çok kuvvetli bağlar oluşabilmektedir [202]. Bu bağları elde etmek amacıyla üretilen nano boyutta ağırlıkça %30 oranında HA esaslı ve %20 oranında lületaşı katkılı (N-H30L20 kodlu) biyo-greftin yüzeyinden genel olarak alınan EDX analiz spektrumu Şekil 4.63'de verilmektedir. Sonuçlara göre, genel olarak yapıda HA ve lületaşı tozuna bağlı olarak Ca, P, O, C, Mg ve Si iyonları görülürken, KH_2PO_4 ve Na_2CO_3 bileşiklerine bağlı olarak da K, P, Na, C ve O iyonları görülmektedir. Bu iyonlardan Ca, P ve O iyonlarının miktarı yüksek, C, Na, K, Mg ve Si iyonlarının miktarı düşüktür.



(a)



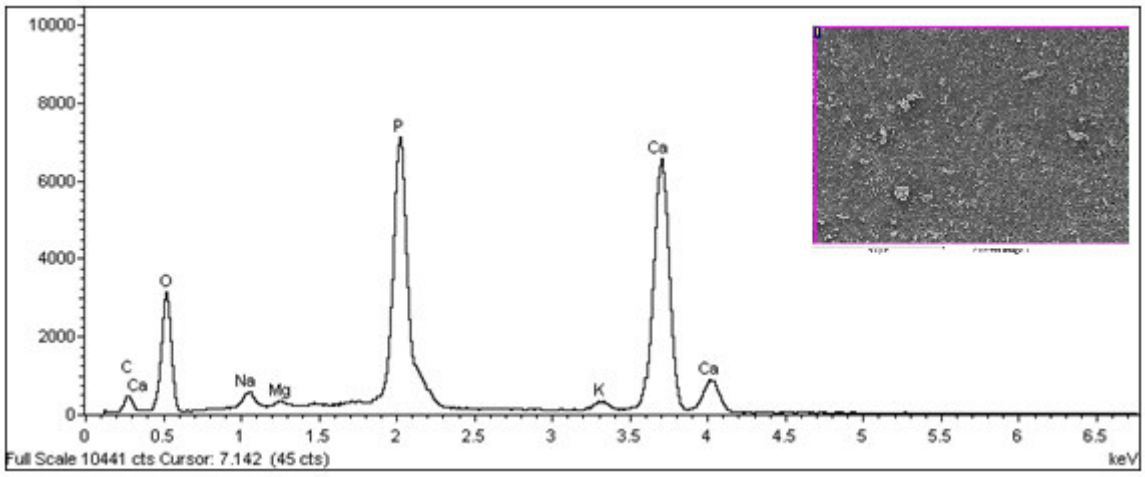
(b)



(c)

Şekil 4.64. N-H30L30 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Nano boyutta HA esaslı ve %30 lületaşı katkılı (N-H30L30 kodlu) biyo-greftin sinterleme sonrası farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.64'de verilmektedir. Şekil 4.64(a) N-H30L30 kodlu biyo-greftin X250 büyütmeden alınan SEM görüntüsünü vermekte olup, numunenin kompakt bir yapıya sahip olduğunu ve yüzeyde farklı boyutlarda apatit tanelerinin oluştuğunu göstermektedir. Şekil 4.64 (b-c)'de verilen N-H30L30 kodlu biyo-greftin X1000 ve X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüsünden, sıvı faz sinterlemesinin oluşmasından dolayı tane sınırlarının net olarak görülmediği ve yüzeyde farklı boyutlarda boşluklar (porozlar) oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca N-H30L20 kodlu biyo-greft ile N-H30L30 kodlu biyo-greft kıyaslandığında, lületaşı oranının artmasıyla birlikte sinterlenebilirliğin ve porozite miktarının arttığı görülmekte olup, por derinliklerininde arttığı ve yüzeyde tane sınırlarına çökelmiş apatit tanelerinin oluştuğu gözlemlenebilmektedir.



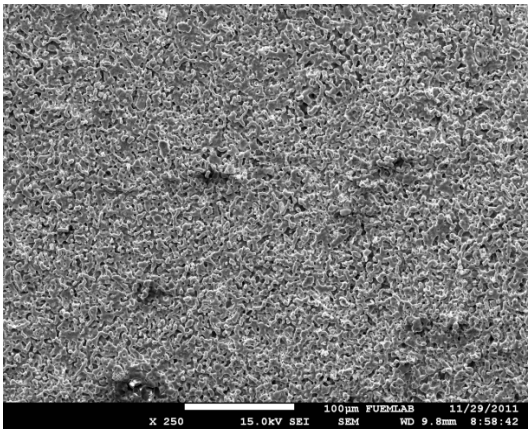
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca	Mg
%Ağırlık	6.82	40.33	1.15	18.17	0.95	32.29	0.30
%Atomik Ağırlık	12.44	55.19	1.10	12.84	0.53	17.64	0.27

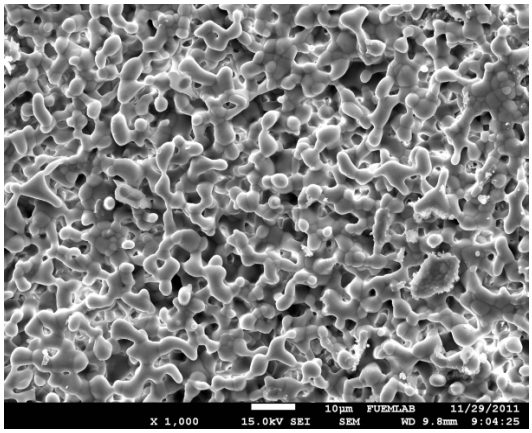
(b)

Şekil 4.65. N-H30L30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu.

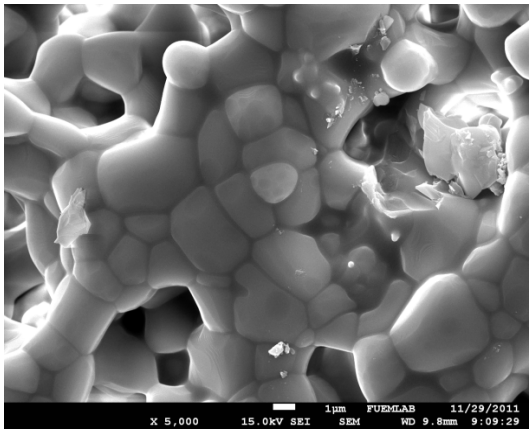
Şekil 4.65 (a-b) nano boyutta ağırlıkça %30 oranında HA esaslı ve %30 oranında lületaşı katkılı (N-H30L30 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede yüzeyinden genel olarak alınan EDX analiz sonucunu vermektedir. N-H30L30 kodlu biyo-greften alınan EDX analiz sonucuna göre, yüksek miktarda Ca, P, O ve C iyonlarıyla, düşük miktarda Na, K ve Mg iyonları içerdiği görülmektedir.



(a)



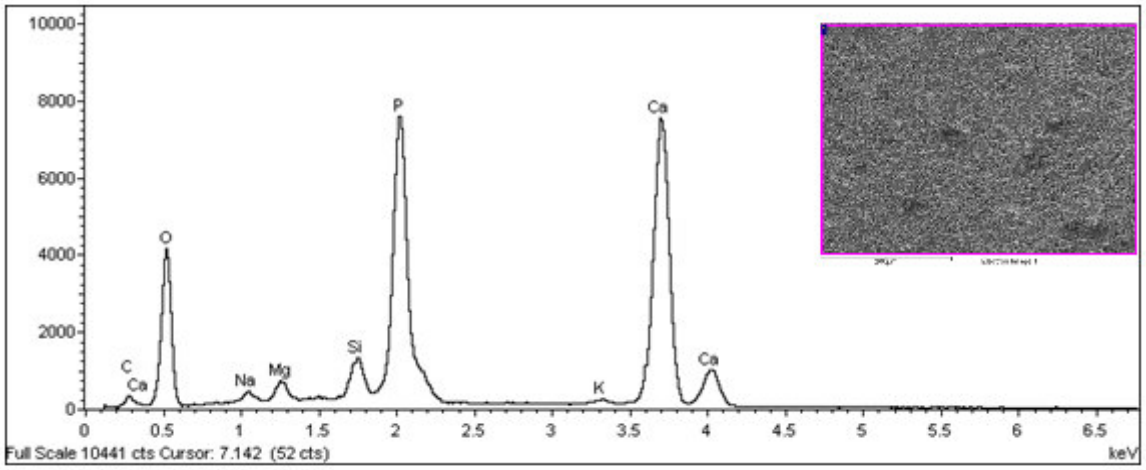
(b)



(c)

Şekil 4.66. N-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri**.**

Yapılan çalışmada, kemiğin ana bileşen malzemesi olan ve tek başına mukavemeti düşük olan HA bileşiğine $CaCO_3$, Mg ve Si içerikli lületaşı tozuyla birlikte KH_2PO_4, P_2O_5 ve Na_2CO_3 ilave edilerek kemiğin kimyasal yapısına ve mekanik özelliklerine benzer greftler üretilmeye çalışılmıştır. Bunun için ağırlıkça %30 oranında nano boyutta HA esaslı ve %40 lületaşı katkılı (N-H30L40 kodlu) biyo-greft üretilmiştir. Şekil 4.66(a-c)'de N-H30L40 kodlu biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü verilmiştir. Şekil 4.66'da 1250ºC'de kontrollü atmosferde sinterlenen N-H30L40 kodlu biyo-greftte, tam bir sinterlemenin elde edildiği görülmüştür. Ayrıca tanelerin dağılımı ve boyutları üniform olmayıp, tane sınırları belirgindir. Tane sınırlarında farklı boyutlarda gözenekli bir yapı elde edilmiştir. N-H30L30 ve N-H30L20 kodlu biyo-greftler ile N-H30L40 kodlu biyo-greft karşılaştırıldığında, lületaşı tozu miktarı arttıkça sinterlenebilirliğin artmasından dolayı taneler arası bağın arttığı, tane boyutlarının küçüldüğü ve gözenekli yapının daha düzenli ve daha derinlere kadar ilerlediği belirlenmiştir.



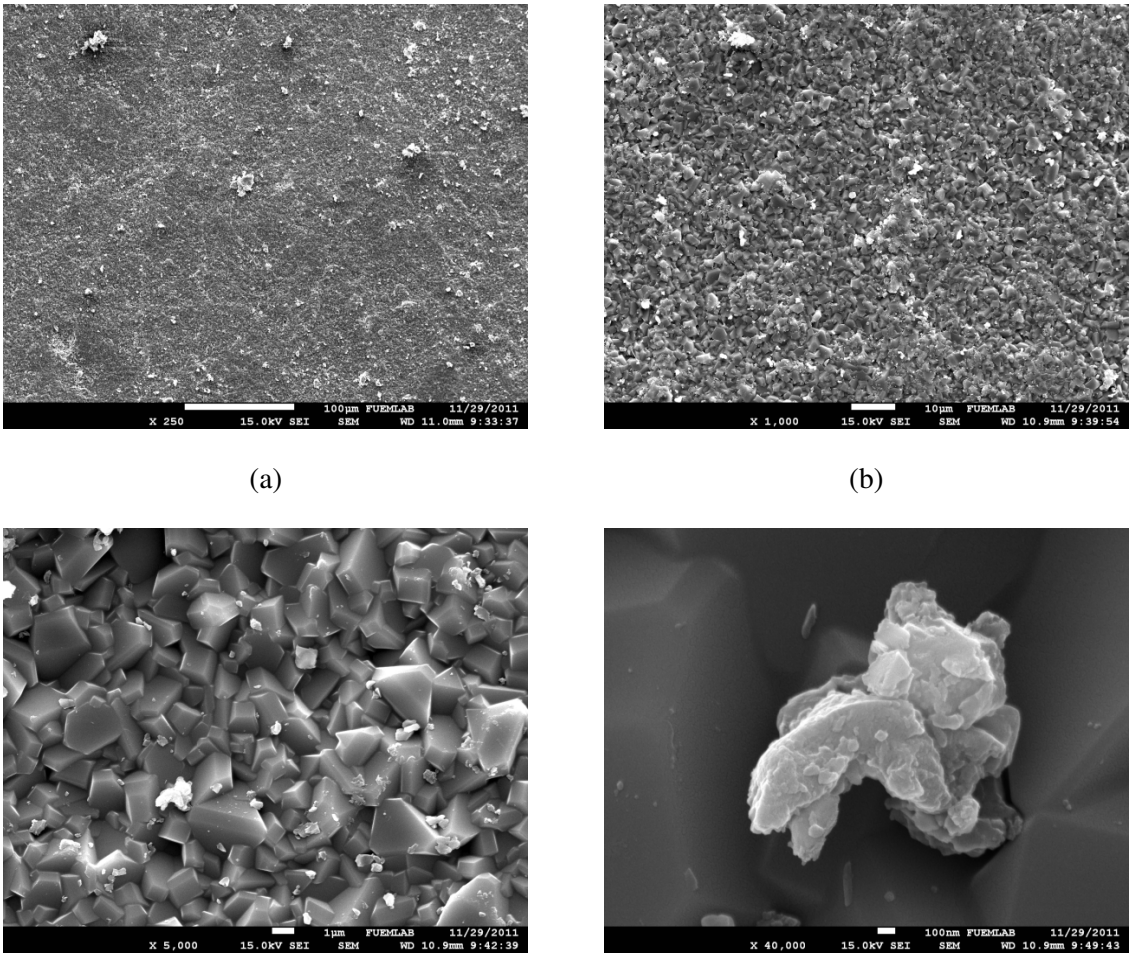
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca	Si	Mg
%Ağırlık	3.26	43.69	0.61	17..22	0.42	31.88	1.90	1.03
%Atomik Ağırlık	6.03	60.67	0.59	12.36	0.24	17.67	1.50	0.94

(b)

Şekil 4.67. N-H30L40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

Şekil 4.67(a-b)'de %30 nano boyutta HA esaslı ve %40 oranında lületaşı katkılı (N-H30L40 kodlu) biyo-greftin EDX analiz sonuçları verilmektedir. Şekil 4.67 (a-b)'de N-H30L40 kodlu biyo-greftin içeriğindeki HA'e ve lületaşına bağlı olarak Ca, P ve O içerdiği ve lületaşının içeriğinde bulunan Mg ve Si elementlerine sahip olduğu görülmektedir.



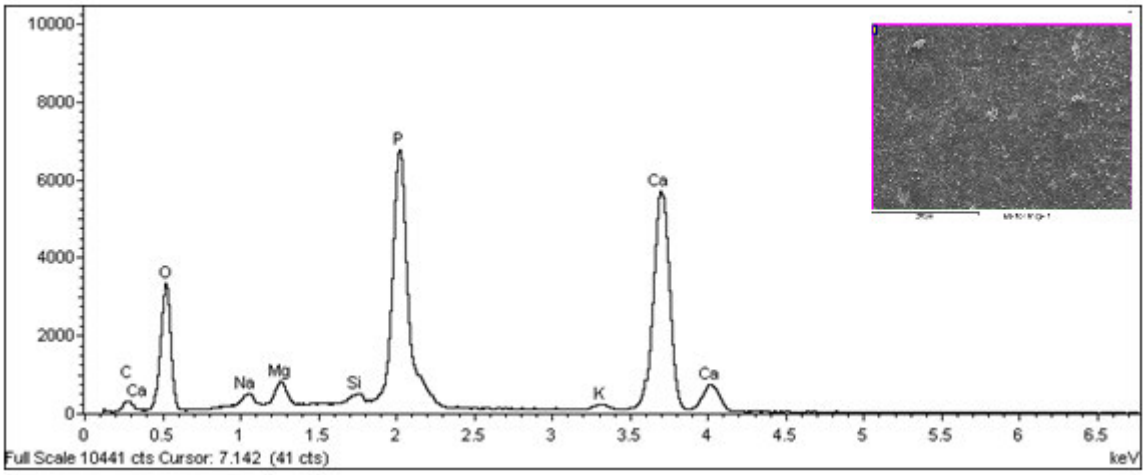
(a) (b)

(c) (d)

Şekil 4.68. M-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000, (c) X5000 ve (d) X40000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Sert dokuda meydana gelen hasarları onarmak için, toksik özelliği olmayan ve kullanıldığı bölgedeki dokularla biyouyumlu özellikteki greftlere olan ihtiyaçlar her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda bu ihtiyaçları gidermek amacıyla kemiğe yakın kimyasal özelliğe sahip doğal ürünler kullanılmaya başlanmıştır. Bunun için sübye kemiği, yumurta kabuğu ve büyükbaş hayvan kemiği gibi $CaCO_3$, $CaPO_4$ içerikli doğal ürünler kullanılmıştır [205,206]. Özellikle doğada karbonat ve oksit içerikli yumurta kabuğu gibi atıkların kimyasal yapıları kemiğe uygun olduğu için tercih edilmiştir. Toplam yumurta ağırlığının %11'i yumurta kabuğu olup, bu yumurta kabuğunun %94'ü kalsiyum karbonat, %1'i kalsiyum fosfat ve %4'ü organik maddeler içermektedir [207]. Ayrıca yumurta kabuğu doğal ürünler içerisinde en ucuz ve en bereketli malzemelerden biri olup implantasyon sırasında insan vücuduyla biyouyumludur, ancak osteokondüktif değildir. Tavuk

yumurta kabuğundan elde edilen CaO, biyoatıkların kullanılmasında sol-jel yöntemiyle üretilen biyomalzemelerin sentezi için etkili olabileceği vurgulanmıştır [208]. Yumurta kabuğunun bu özelliklerine bağlı olarak, %30 mikron boyutta HA esaslı ve %20 mikron boyutta yumurta kabuğu kullanılarak üretilen M-H30Y20 kodlu biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.68 (a-d)'de verilmektedir. M-H30Y20 kodlu biyo-greftin SEM görüntülerinden tam bir sinterlemenin elde edildiği ve buna bağlı olarak da biyo-greftin yüksek densifikasyon rejimine sahip olduğu görülmektedir. Şekil 4.68 (c)'de tanelerin düzensiz dağıldığı, tane yapılarının küresel değil de keskin köşelere sahip farklı geometrilerden oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca yüzeyde oluşan apatit tanelerinin tane sınırlarına çöktüğü de Şekil 4.68 (d)'de gözlenmektedir.



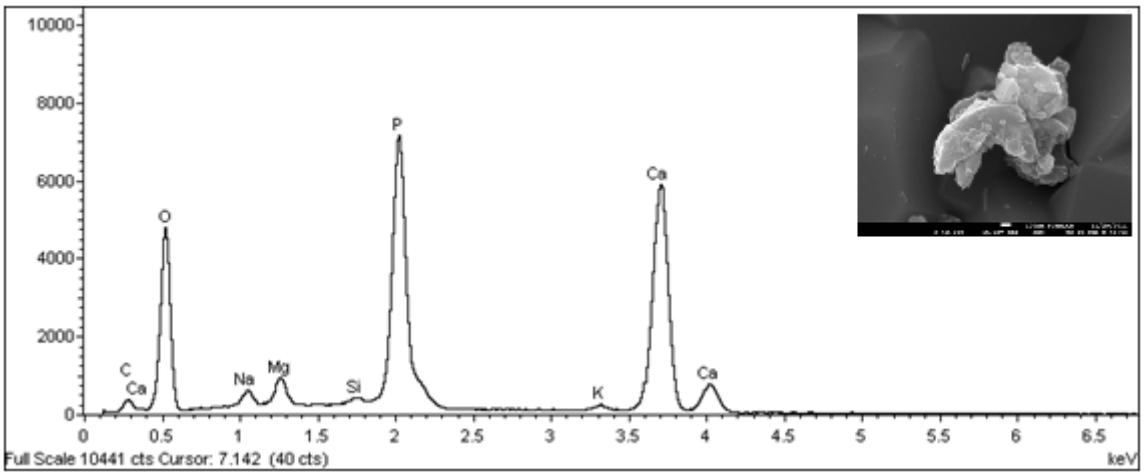
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca	Si	Mg
%Ağırlık	3.55	43.17	0.96	18.97	0.59	30.71	0.54	1.52
%Atomik Ağırlık	6.55	59.81	0.93	13.57	0.33	16.98	0.43	1.39

(b)

Şekil 4.69. H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

Şekil 4.69 (a-b) ağırlıkça %30 oranında mikron boyutta HA esaslı ve %20 yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y20 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX analiz sonuçlarını vermektedir. Yapıda HA ve yumurta kabuğuna bağlı olarak yüksek miktarda Ca, P, O içerikli iyonların oluştuğu görülürken, yumurta kabuğu, Na_2CO_3 ve KH_2PO_4 bileşiklerine bağlı olarak da K, Si,Mg ve Na iyonlarının oluştuğu gözlenmektedir.



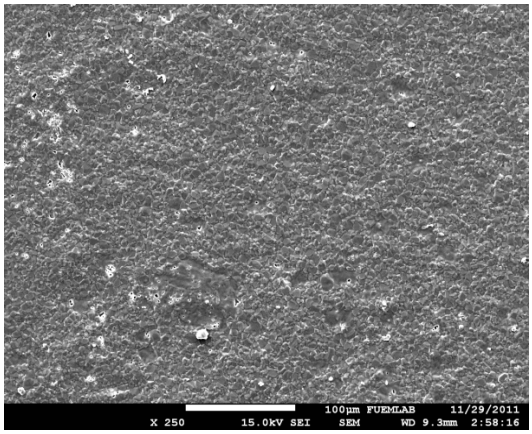
(a)

Element	C	O	Na	P	K	Ca	Si	Mg
%Ağırlık	3.68	48.67	1.06	17.37	0.49	26.93	0.31	1.50
%Atomik Ağırlık	6.51	64.55	0.98	11.90	0.26	14.26	0.23	1.31

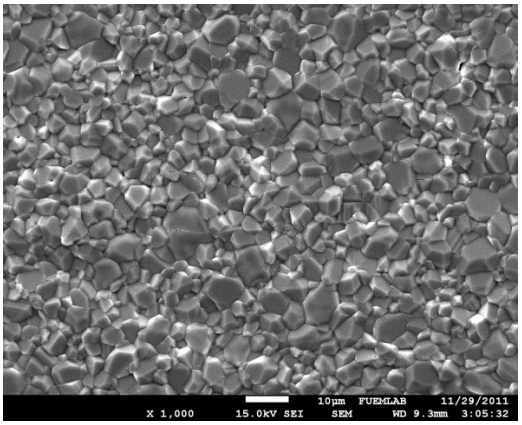
(b)

Şekil 4.70. M-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede apatit taneleri üzerinden alınan EDX spektrumu

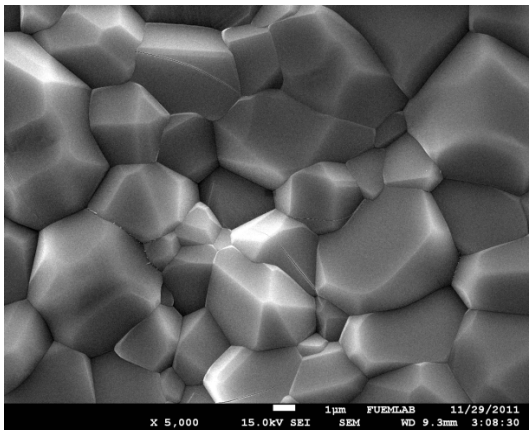
Mikron boyutta HA esaslı ve %20 oranında yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y20 kodlu) biyo-greftin yüzeyinde oluşan apatit tanelerinden alınan EDX analiz spektrumu Şekil 4.70'de verilmektedir. Sonuçlara göre, M-H30Y20 kodlu biyo-greftin içeriğindeki HA ve yumurta kabuğuna bağlı olarak yüksek miktarda Ca, P, O içerikli bileşiklerin oluştuğu görülürken, yumurta kabuğu ve KH_2PO_4 bileşiklerine bağlı olarak da düşük miktarda C, K, Si, Mg içerikli bileşiklerin oluştuğu görülmektedir. Fakat X250 büyütmede genel olarak alınan EDX sonuçlarıyla kıyaslandığında, yüzeyde oluşan apatitlerin genel yapıya göre daha düşük miktarda Ca ve P, yüksek miktarda da C ve O içerdiğinden dolayı, bu tanelerin yüksek C içerikli apatit taneleri olduğu belirlenmektedir.



(a)



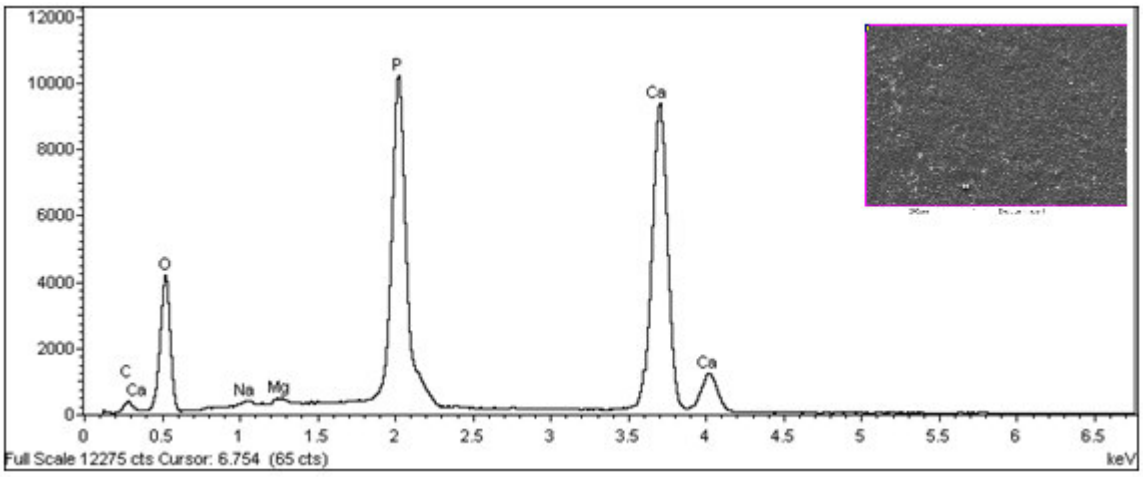
(b)



(c)

Şekil 4.71. M-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Mikron boyutta HA esaslı ve %30 oranında yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y20 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.71'de verilmektedir. SEM görüntülerine göre, M-H30Y20 kodlu biyo-greftte tam bir sinterleme oluştuğundan dolayı yüksek densifikasyon görülürken, tane dağılımlarının ve şekillerinin düzensiz olduğu ve tane sınırlarının belirgin olduğu görülmektedir(Şekil 4.71 (b-c)). M-H30Y30 kodlu biyo-greft le M-H30Y20 kodlu biyo-greft kıyaslandığında, tane şekillerinin ve diziliminin daha düzenli olduğu ve tane boyutlarının daha büyük olduğu gözlenmektedir.



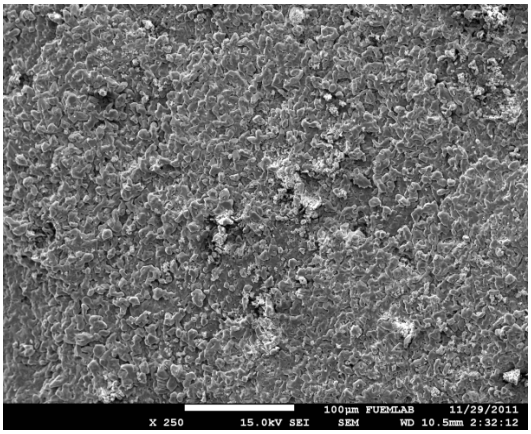
(a)

Element	C	O	Na	P	Ca
%Ağırlık	3.40	41.39	0.29	0.29	34.69
%Atomik Ağırlık	6.42	58.75	0.28	0.27	19.65

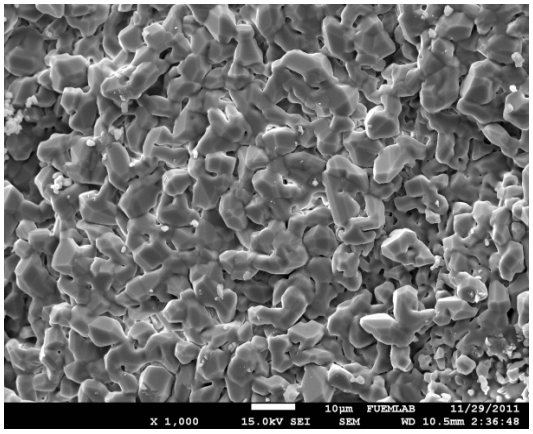
(b)

Şekil 4.72. M-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

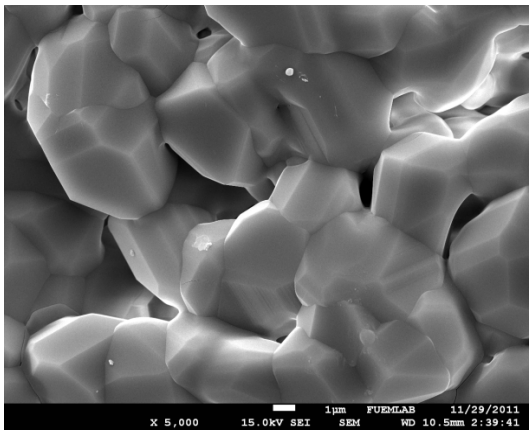
Mikron boyutta HA esaslı ve %30 yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y20 kodlu) biyo-greftin EDX analiz spektrumu Şekil 4.72 (a-b)'de verilmektedir. Şekil 4.72 (a)'da verilen SEM görüntülerinde, belirgin tane sınırlarının oluştuğu ve Şekil 4.72 (a-b)'de verilen EDX sonuçlarına göre, M-H30Y20 kodlu biyo-greftin C, O, Na, P ve Ca içerikli bileşiklerden oluştuğu da görülmektedir. Bunun yanında EDX sonuçlarından, M-H30Y20 kodlu biyo-greftte yüksek miktarda Ca ve O iyonlarının bulunduğu ve düşük miktarda da C, Na ve P iyonlarının bulunduğu belirlenmiştir.



(a)



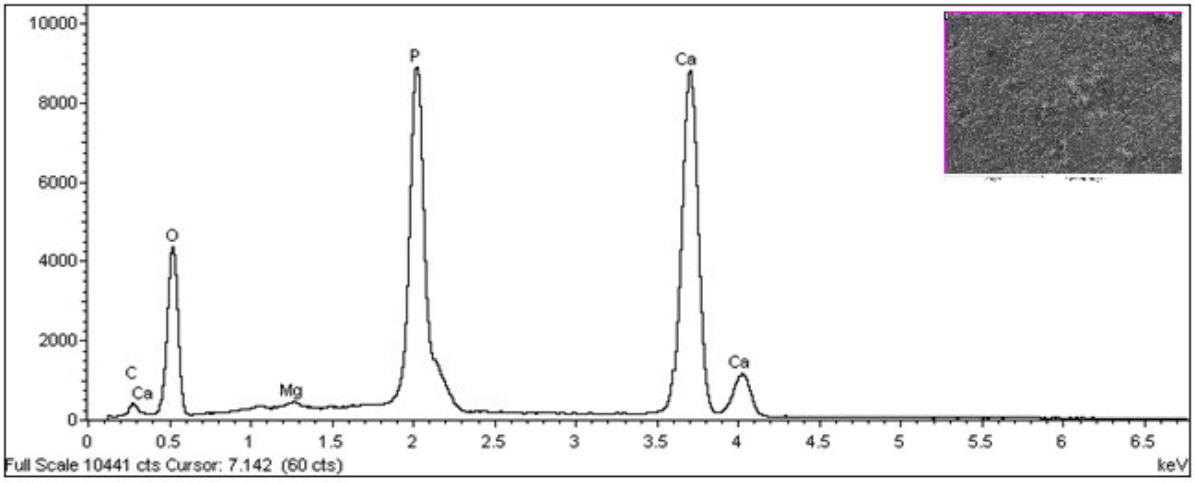
(b)



(c)

Şekil 4.73. M-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Mikron boyutta HA esaslı ve %40 oranında yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y40 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.73 (a-c)'de verilmektedir. Şekil 4.73 (a-c)'de verilen SEM görüntülerine göre, M-H30Y40 kodlu biyo-greftte düzensiz tane şekillerine ve tane dağılımına sahip bir yapının oluştuğu görülürken, tam bir densifikasyonun olduğu ve sınırlarda düşük miktarda boşlukların (porların) oluştuğu da gözlenmektedir. M-H30Y40 kodlu biyo-greft M-H30Y20 ve M-H30Y30 kodlu biyo-greftlerle kıyaslandığında, sinterlemenin daha iyi olduğu, tane sınırlarının daha az belirgin olduğu ve tane boyutlarının daha büyük olduğu görülürken, tane şekillerinin küreselliğinin artıp keskin köşelerin azaldığı belirlenmektedir. Ayrıca M-H30Y20 ve M-H30Y30 kodlu biyo-greftlerde mevcut olmayan gözeneklerin M-H30Y40 kodlu biyo-greftler de görüldüğü gözlenmektedir.



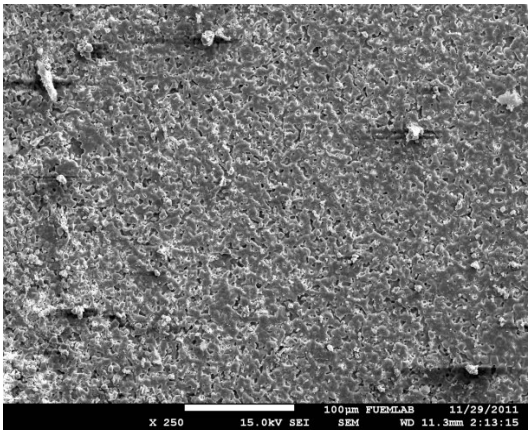
(a)

Element	C	O	Mg	P	Ca
%Ağırlık	3.45	44.30	0.23	18.06	33.95
%Atomik Ağırlık	6.39	61.58	0.21	12.97	18.84

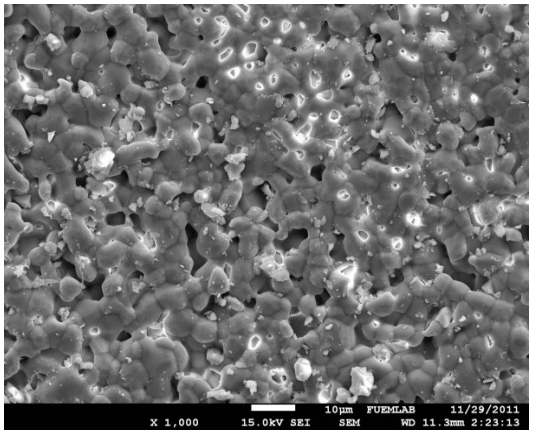
(b)

Şekil 4.74. M-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX analiz spektrumu.

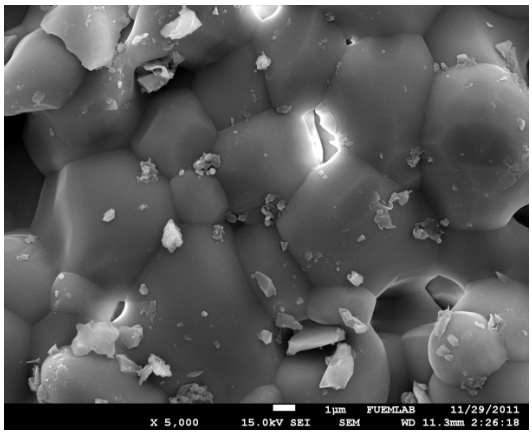
Mikron boyutta HA esaslı ve %40 oranında yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y40 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX analiz spektrumu Şekil 4.74 (a-b)'de verilmektedir. Şekil 4.74 (a-b)'de verilen SEM görüntülerinden belirgin olmayan tane sınırlarının oluştuğu ve EDX sonuçlarına göre de, M-H30Y40 kodlu biyo-greftin yüksek miktarda Ca, O ve P iyonları ve düşük miktarda C ve Mg iyonları içerdiği görülmektedir. M-H30Y20 ve M-H30Y30 kodlu biyo-greftler M-H30Y40 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında, bütün biyo-greftlerde benzer sonuçlar görülmektedir. Böylece M-H30Y30 ve M-H30Y40 kodlu biyo-greftlerin EDX analiz sonuçların da, C, O, Mg, P ve Ca elementlerine bağlı bileşiklerin oluştuğu görülürken, M-H30Y20 kodlu biyo-greftte bu elementlerin dışında Si elementinin bulunduğu gözlenmektedir.



(a)



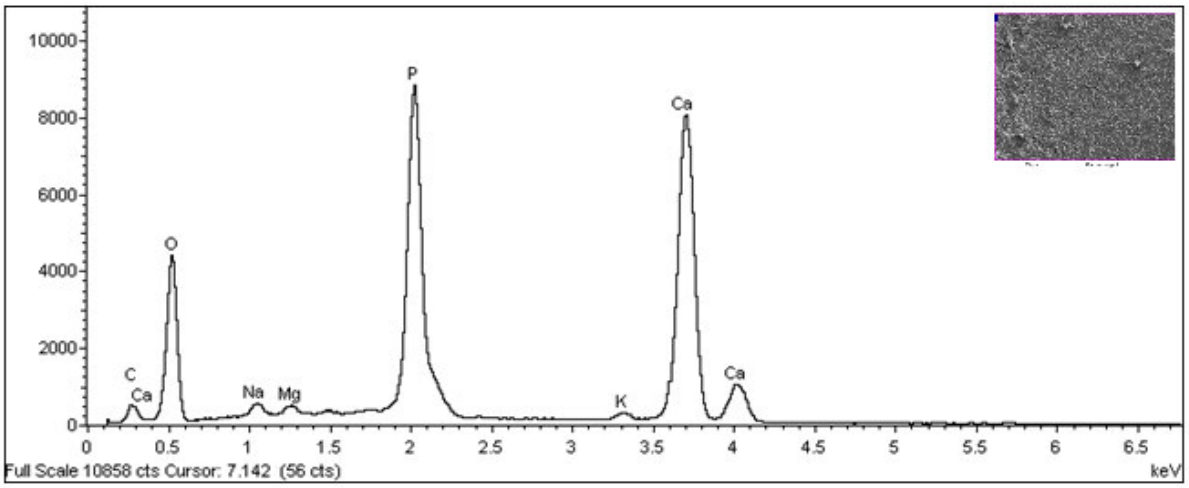
(b)



(c)

Şekil 4.75. N-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Nano boyutta HA esaslı ve %20 mikron boyutta yumurta kabuğu katkılı (N-H30Y20 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.75 (a-c)'de verilmektedir. N-H30Y20 kodlu biyo-greftin SEM görüntülerinde, farklı tane boyutlarına sahip dağınık bir tane dağılımının oluştuğu görülürken, yapıda sıvı faz sinterlemesine bağlı tam bir sinterlemenin oluştuğu da görülmektedir. Ayrıca tane sınırlarında farklı boyutlarda oluşan gözenekler görülürken, gözeneklerin boyutları arttıkça derinliklerinin de arttığı ve küçük gözeneklerin etrafında beyaz bir tabakanın oluştuğu gözlenmektedir. N-H30Y20 kodlu biyo-greft M-H30Y20 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında, N-H30Y20 kodlu biyo-greftin tanelerinin daha küresel ve küçük olduğu ve tane sınırların da M-H30Y20 kodlu biyo-greftten farklı olarak gözenekli yapının oluştuğu görülmektedir.



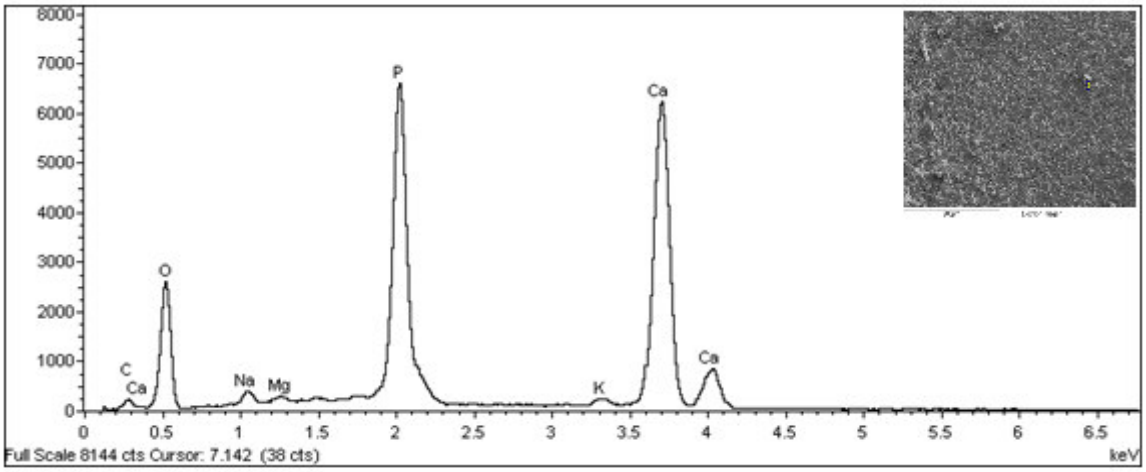
(a)

Element	C	O	Na	Mg	P	K	Ca
%Ağırlık	4.61	43.63	0.76	0.45	17.98	0.55	32.02
%Atomik Ağırlık	8.42	59.86	0.72	0.41	12.75	0.31	17.54

(b)

Şekil 4.76. N-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

Nano boyutta HA esaslı ve %20 oranında yumurta kabuğu katkılı (N-H30Y20 kodlu) biyo-greftin genel olarak yüzeyinden alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.76(a-b)'de verilmektedir. EDX sonuçlarına göre, N-H30Y20 kodlu biyo-greftte yüksek oranda Ca, O ve P elementleri görülürken, düşük oranda da C, Na, Mg ve K elementlerinin bulunduğu görülmektedir. M-H30Y20 kodlu biyo-greft ile N-H30Y20 kodlu biyo-greft kıyaslandığında ise, aynı elementlerin birbirine yakın oranlarda olduğu gözlenmektedir.



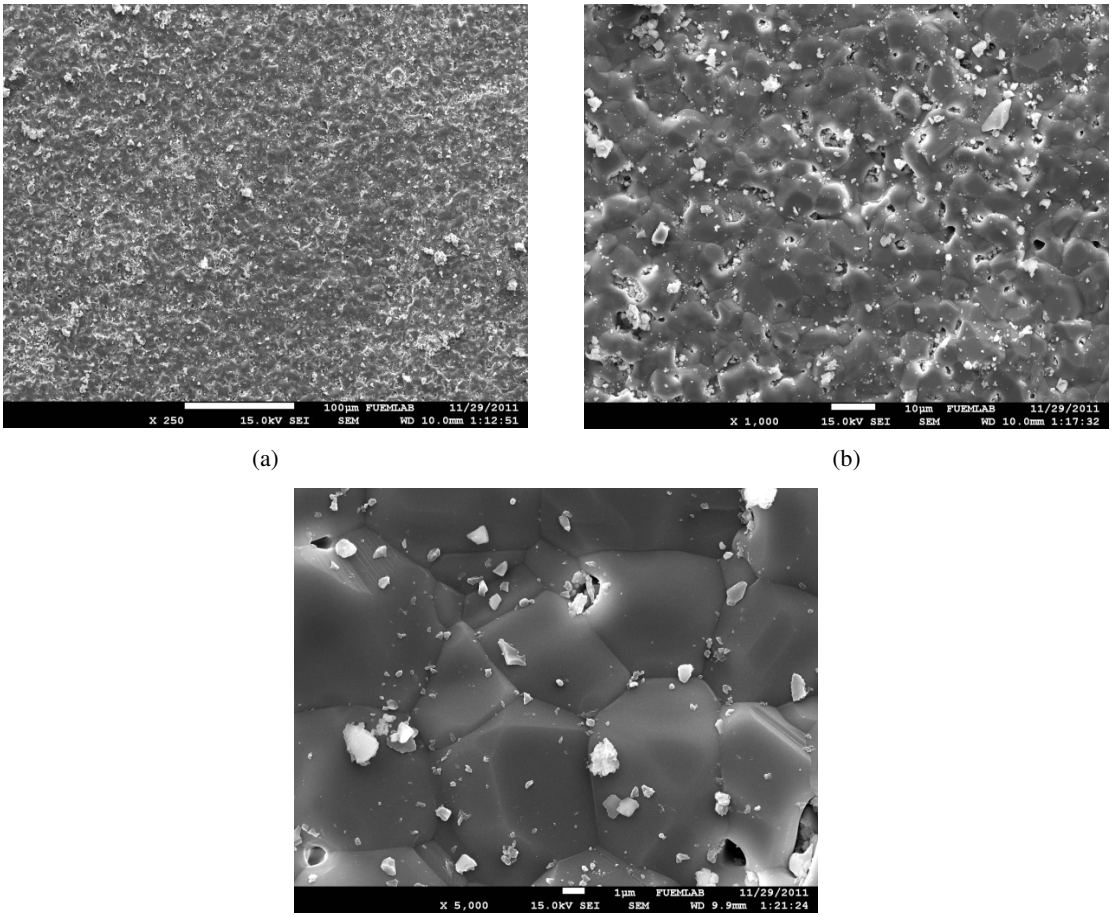
(a)

Element	C	O	Na	Mg	P	K	Ca
%Ağırlık	2.35	40.44	0.92	0.27	19.73	0.71	35.58
%Atomik Ağırlık	4.54	58.54	0.93	0.25	14.76	0.42	20.56

(b)

Şekil 4.77. N-H30Y20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede apatit taneleri üzerinden alınan EDX spektrumu

Nano boyutta HA esaslı ve %20 mikron boyutta yumurta kabuğu tozu katkılı (N-H30Y20 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede apatit taneleri üzerinden alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.77 (a-b)'de verilmektedir. Yüzeyde oluşan apatit tanelerinden alınan EDX analiz sonucuyla genel olarak alınan EDX sonuçları kıyaslandığında, yapıda aynı elementlerin bulunduğu görülürken, C, Ca, O, Mg ve P elementlerinin miktarının X250 büyütmede genel olarak alınan EDX sonucuna göre daha az olduğu ve Na ve K miktarının yüksek olduğu görülmektedir.

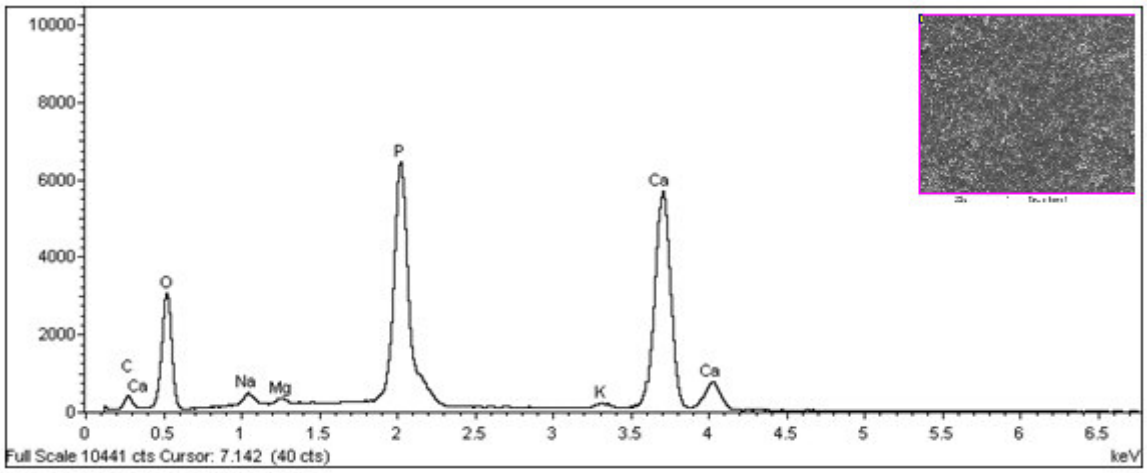


(a) (b)

(c)

Şekil 4.78. N-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Nano boyutta HA esaslı ve ağırlıkça %30 oranında yumurta kabuğu katkılı (N-H30Y30 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.78 (a-c)'de verilmektedir. Şekil 4.78 (a-c)'de N-H30Y30 kodlu biyo-greftte yüksek sıcaklıkta sinterleme sonrası sıvı faz sinterlemesine bağlı olarak tam bir sinterlemenin oluştuğu görülmektedir. Ayrıca yapıda belirgin tane sınırları, bazı bölgelerde küçük boyutlarda tanelerin toplandığı ve tane sınırlarında derin gözenekli yapıların oluştuğu gözlenmektedir. N-H30Y20 kodlu biyo-greft ile N-H30Y30 kodlu biyo-greft kıyaslandığında, N-H30Y30 kodlu biyo-greftte yumurta kabuğu miktarı arttıkça sinterlenebilirliğin arttığı ve gözenek miktarı ve boyutunun azaldığı tespit edilmiştir. M-H30Y30 kodlu biyo-greft ile N-H30Y30 kodlu biyo-greft karşılaştırıldığında ise, N-H30Y30 kodlu biyo-greftte tanelerin daha küresel olduğu, M-H30Y30 kodlu biyo-greftte görülen tanelerdeki keskin köşeli yapının N-H30Y30 kodlu biyo-greftte olmadığı ve N-H30Y30 kodlu biyo-greftte gözenekli yapının oluştuğu görülmektedir.



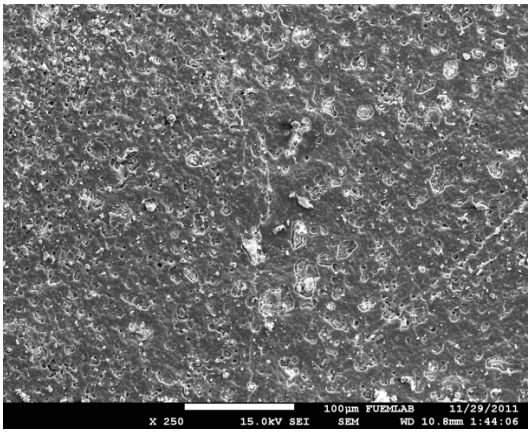
(a)

Element	C	O	Na	Mg	P	K	Ca
%Ağırlık	5.46	42.97	0.92	0.37	18.41	0.60	31.26
%Atomik Ağırlık	9.92	58.57	0.87	0.33	12.96	0.34	17.01

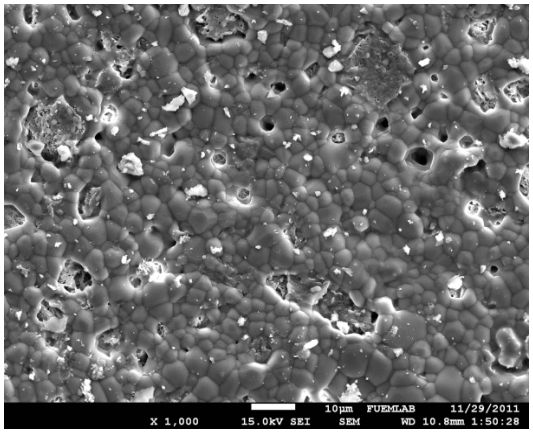
(b)

Şekil 4.79. N-H30Y30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

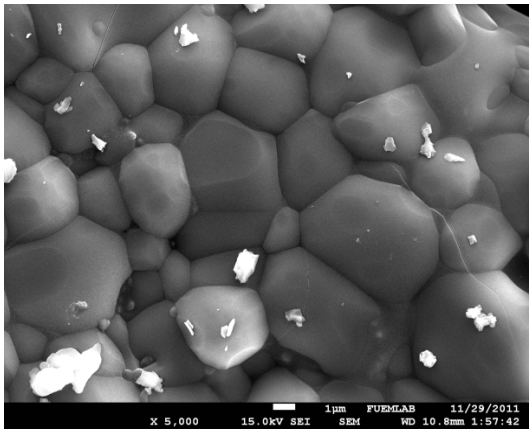
Nano boyutta HA esaslı ve $CaCO_3$, $CaPO_4$ ve Mg içeriğine sahip %30 mikron boyutta yumurta kabuğu katkılı (N-H30Y30 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.79 (a-b)'de verilmektedir. M-H30Y30 kodlu biyo-greft ile N-H30Y30 kodlu biyo-greft karşılaştırıldığında, N-H30Y30 kodlu biyo-greftin M-H30Y30 kodlu biyo-greftten farklı olarak Mg ve K elementlerini içerdiği ve N-H30Y20 kodlu biyo-greftle karşılaştırıldığında ise, yapıda aynı elementlerin (C, O, Ca, P, Na, Mg ve K) bulunduğu görülmektedir.



(a)



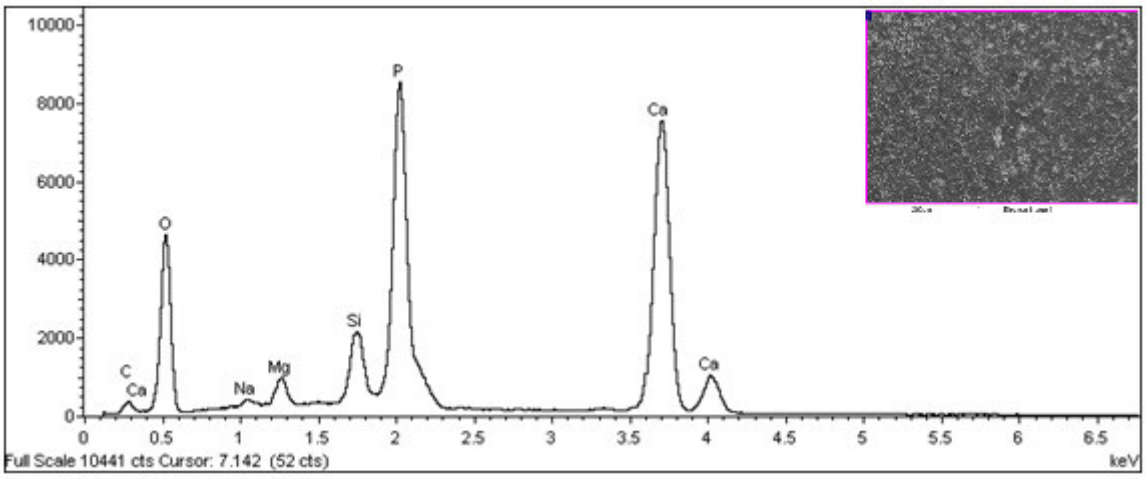
(b)



(c)

Şekil 4.80. N-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Nano boyutta HA esaslı ve %40 mikron boyutta yumurta kabuğu katkılı (N-H30Y40 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.80 (a-c)'de verilmektedir. N-H30Y40 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede yüzeyinden alınan SEM görüntülerine göre, tam bir densifikasyonun oluştuğu görülürken, yüzeyde apatit tanelerinin ve gözenekli (poroz) yapının oluştuğu gözlenmektedir (Şekil 4.80 (a)). X1000 ve X5000 büyütmelerde alınan SEM görüntülerinde ise, tane sınırları ve gözeneklerin daha net olduğu görülebilmektedir(Şekil 4.80(b-c)). N-H30Y40 kodlu biyo-greft N-H30Y20 ve N-H30Y30 kodlu biyo-greftlerle kıyaslandığında, daha belirgin tane sınırlarının oluştuğu, bölge bölge oluşan küçük tane yapıların yumurta kabuğu miktarı arttıkça arttığı ve gözenekli yapının azaldığı görülmektedir. Ayrıca N-H30Y40 kodlu biyo-greftte N-H30Y20 ve N-H30Y30 kodlu biyo-greftlere göre, taneler arasında beyaz renkte görülen apatit tanelerinin oluştuğu Şekil 4.80 (a-c)'de belirlenmiştir.



(a)

Element	C	O	Na	Mg	P	Si	Ca
%Ağırlık	3.80	43.97	0.34	1.29	17.80	3.12	29.68
%Atomik Ağırlık	6.93	60.29	0.33	1.16	12.61	2.43	16.24

(b)

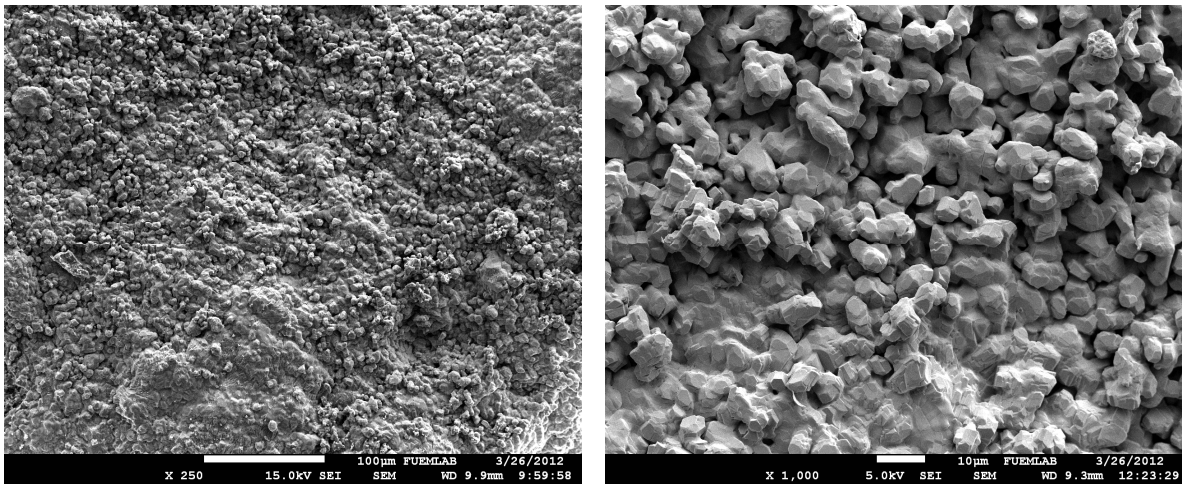
Şekil 4.81. N-H30Y40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

Nano boyutta HA esaslı ve %40 oranında yumurta kabuğu katkılı (N-H30Y40 kodlu) iyo-greftin X250 büyütmede genel olarak alınan EDX analiz spektrumu Şekil 4.81 (a-b)'de verilmektedir. N-H30Y20 ve N-H30Y30 kodlu biyo-greftlerde görülen C, O, Ca, P, Na, Mg ve K iyonlarının N-H30Y40 kodlu biyo-greftte de görüldüğü belirlenmiştir. Sadece diğer greftlerden farklı olarak N-H30Y40 kodlu biyo-greftde Si elementi de gözlenmektedir. Ayrıca N-H30Y40 kodlu biyo-greftte Ca oranı diğer yumurta kabuğu içerikli biyo-greftlere göre daha düşük olduğu ve C ve O miktarının N-H30Y20 kodlu biyo-greftten düşük N-H30Y30 kodlu biyo-greftten de daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.3.4. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Esaslı) Biyo-Greftlerin SEM-EDX Sonuçları

Kemik makro düzeyde kortikal (veya kompakt) ve kanseloz (veya trabeküler) olmak üzere iki bölüme ayrılır. Bu iki yapı yoğunluk ve porozite bakımından birbirinden ayrılırlar [56]. Kortikal kemik sıkı tertiplenmiş, boşluk içermeyen bir dokudur, maksimum 1.8 g/cm^3 yoğunluğu sahiptir. Kanseloz kemik dokusu ise gevşek, labirent veya bol boşluklu bir görünüme sahiptir. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Yetişkin bir bireyin iskeletindeki kemiklerin % 80i kortikal, % 20'si de kanseloz kemikden oluşmaktadır. Kemiğin bu özelliklerinden dolayı kemik yerine kullanılabilecek

greft üretiminde, yüzeye-bağımlı karakterdeki vücut hücrelerinin yüzeye tutunma ve üremesi için yüzey alanının mümkün olduğunca geniş olması gerekmektedir. Bu nedenle doku yapıları (tissue scaffold) gözenekli yapılar şeklinde üretilmektedir. Makro gözenekli yapıların elde edilmesinde gözenek yapıcı malzeme (porojen) seçimi dikkat edilmesi gereken bir noktadır. Porojenin inert olması ve yapıya zarar vermeden kolayca uzaklaştırılabilmesi gerekmektedir [97,249]. Bu amaçlar doğrultusunda yaptığımız çalışmada, HA, biyocam, sübye kemiği tozu, lületaşı tozu esaslı bileşiklere polimer (jelatin) ilave edilerek poroz yapı elde edilmeye çalışılmış ve bunların mikroskobik görüntüsü incelenip, mekanik özellikleri ve in vitro deneyleri yapılarak morfolojik, mekanik ve toksik özellikleri karşılaştırılmıştır.

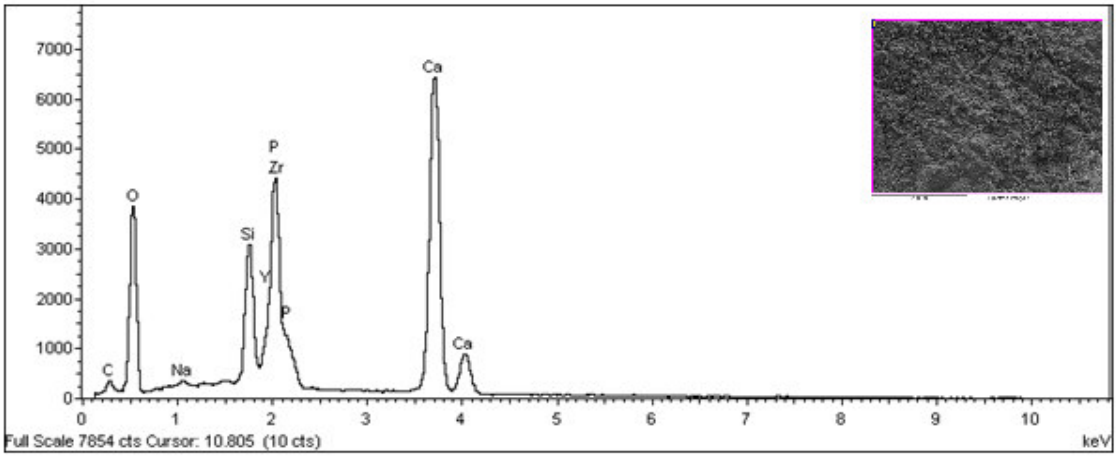


(a) (b)

Şekil 4.82. H40ZrYt kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Poroz yapıya sahip biyo-greftlerin kemik üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmada, poroz biyo-greftler kompakt yapıdaki biyo-greftlerle kıyaslanmıştır. Bu karşılaştırmayı yapmak amacıyla, poroz yapıda olmayan H40ZrYt kodlu biyo-greft üretilmiştir. Jelatin içerikli olmayan H40ZrYt kodlu biyo-greft %40 HA esaslı olup mekanik özelliklerini yükseltmek amacıyla Zr ve Ytria içeriklidir.

Şekil 4.82 (a-b)'de H40ZrYt kodlu biyo-greftin X250 ve X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri verilmektedir. X250 büyütmede H40ZrYt kodlu biyo-greftin homojen olmayan bir tane dağılımına sahip olduğu görülürken, poroz yapıya sahip olmayan (kompakt) bir yapıda olduğu da görülmektedir (Şekil 4.82 (a)). X1000 büyütmede H40ZrYt kodlu biyo-greftin heterojen tane dağılımına sahip olduğu ve bazı bölgelerde sıvı faz sinterlemesine bağlı güçlü bir bağ yapısının oluştuğu da belirlenmektedir (Şekil 4.82(b)).



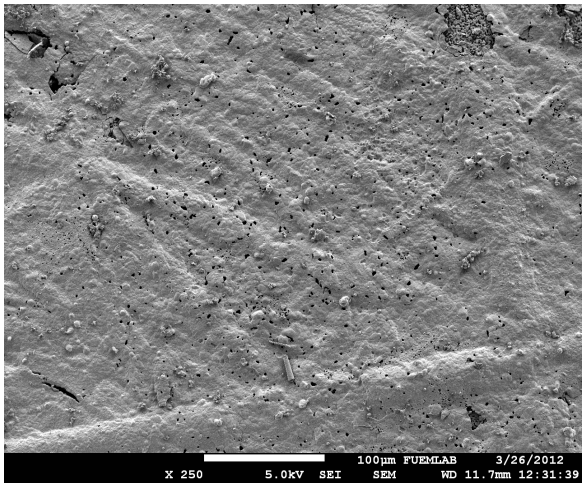
(a)

Element	C	O	Na	Si	P	Y	Ca
%Ağırlık	4.37	45.84	0.29	6.27	9.41	1.74	31.77
%Atomik Ağırlık	7.93	62.50	0.27	4.87	6.63	0.43	17.29

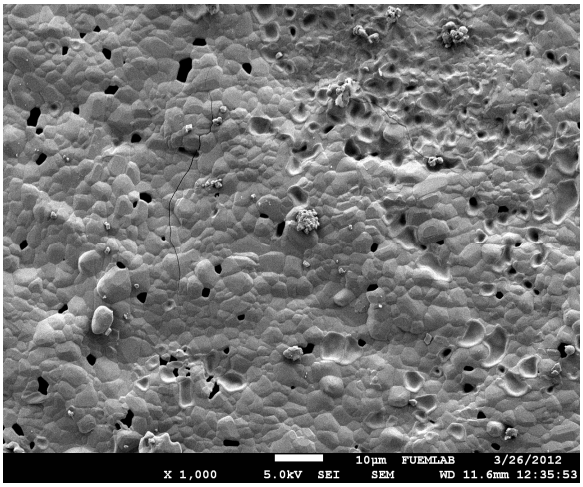
(b)

Şekil 4.83. H40ZrYt kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

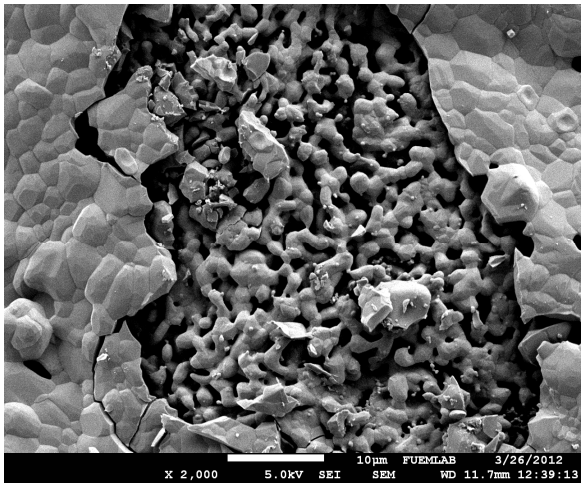
Nano boyutta %40 oranına sahip HA esaslı ve %10 Zr ve Y_2O_3 katkılı (H40ZrYt kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak yüzeyinden alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.83 (a-b)'de verilmektedir. EDX sonuçlarına göre, H40ZrYt kodlu biyo-greftte yüksek oranda Ca ve O iyonları görülürken, düşük oranda da P, C, Na, Si ve Y iyonlarının bulunduğu gözlenmektedir.



(a)



(b)

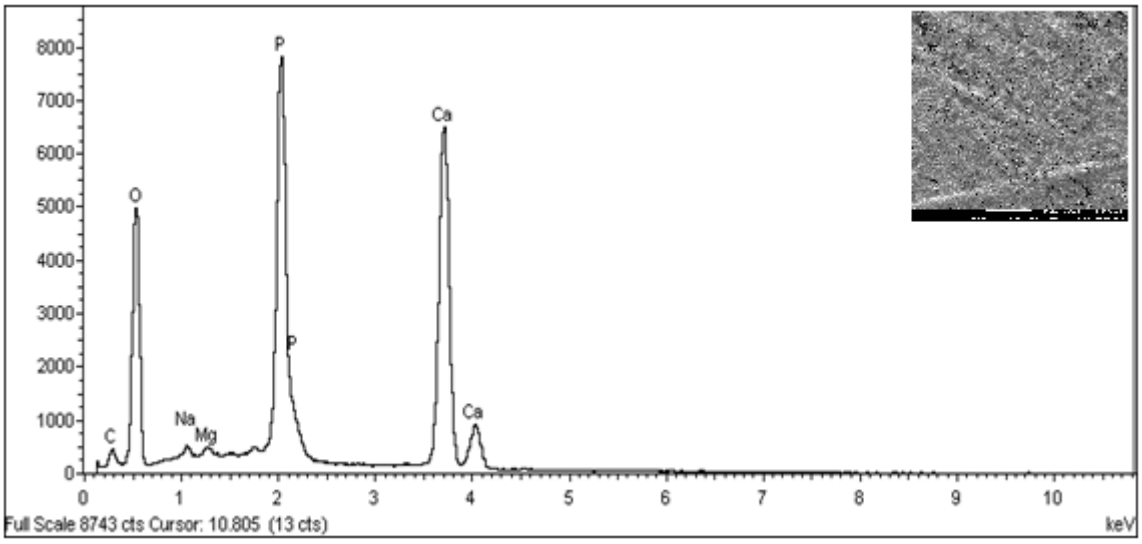


(c)

Şekil 4.84. H30G20 kodlu alternatif biyo-greftin (a) X250, (b) X1000 ve (c) X2000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

HA esaslı ve %20 jelatin içerikli H30G20 kodlu biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.84 (a-c)'de verilmektedir. Üretim sonrası jel halinde olan biyo-greft dairesel şekildeki kalıplara dökülerek ve sıkıştırma yöntemi kullanılmadan şekillendirilmiştir. Şekillendirme sonrası 24 saat oda sıcaklığında yaşlandırıldıktan sonra, 3 saat 500ºC'de kurutulmuş ve 1200ºC'de vakum atmosferinde sinterlenmiştir. Sinterleme sonrası X250 büyütmedeki SEM görüntüsü, biyo-greftin yüzeyinde poroz yapıda bir düzlemin oluştuğunu gösterirken, bölge bölge yüzeyde oluşan kırılmalardan malzemenin iç yapısının daha yüksek miktarda poroz yapıya sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.84(a-c)). Ayrıca yüzeyde oluşan katmanda sıvı faz sinterlemesinin oluştuğu ve buna bağlı olarak poroz miktarının düşük olduğu X1000 büyütmedeki SEM görüntüsünden gözlemlenebilmektedir. (Şekil 4.84(b)). X2000 büyütmede ise biyo-greftin iç

yapısının yüzeyde oluşan katmandan daha yüksek poroz miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.84(c)).



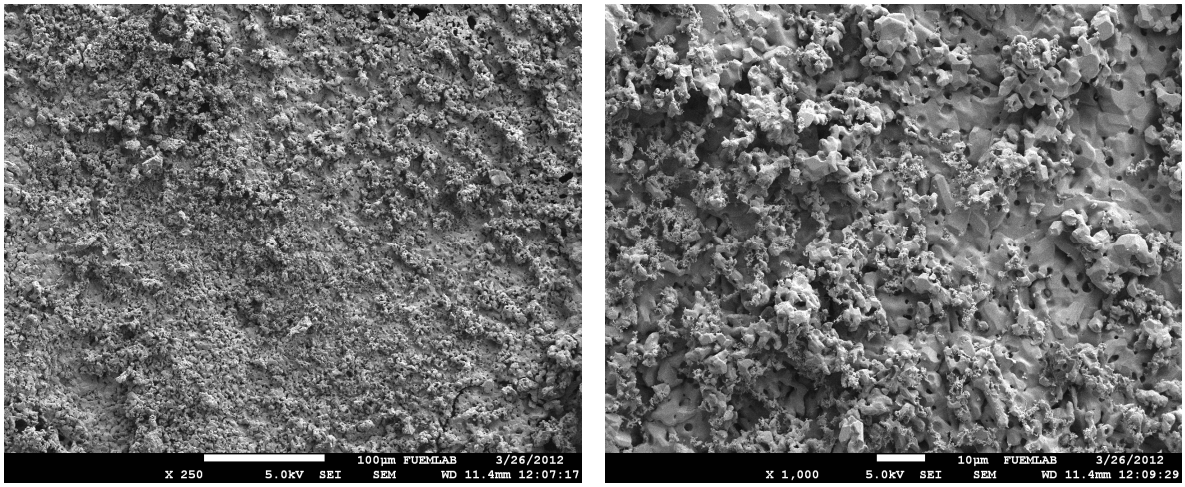
(a)

Element	C	O	Mg	P	Ca
%Ağırlık	4.31	49.09	0.32	17.63	28.11
%Atomik Ağırlık	7.57	64.81	0.28	12.02	14.82

(b)

Şekil 4.85. H30G20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede yüzeyinden alınan EDX spektrumu

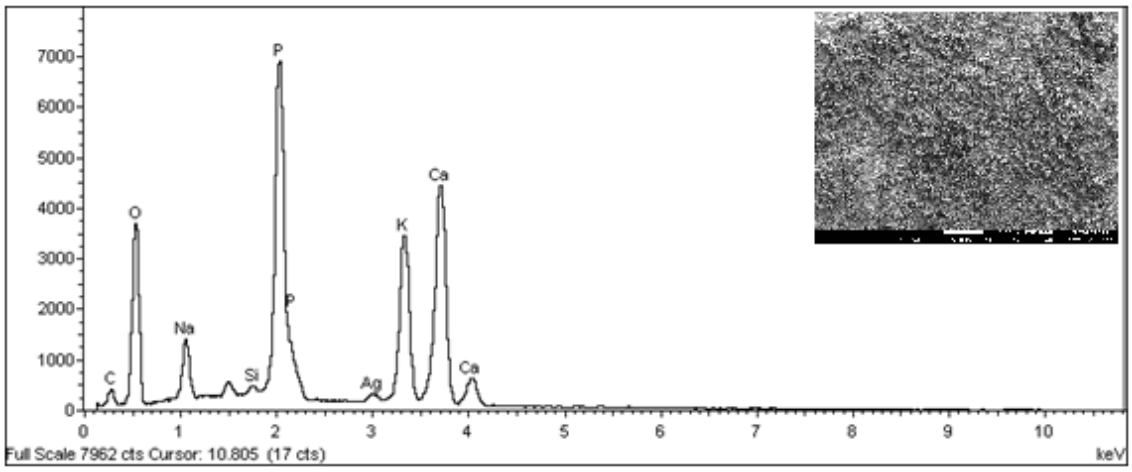
HA esaslı ve %20 jelatin katkılı (H30G20 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.85 (a-b)'de verilmektedir. EDX analiz sonucuna göre, H30G20 kodlu biyo-greft yüksek miktarda Ca, P ve O içerirken, düşük miktarda da C ve Mg içermektedir.



(a) (b)

Şekil 4.86. H30G30 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Poroz yapıya sahip HA esaslı ve %30 jelatin katkılı (H30G30 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.86 (a-b)'de verilmektedir. Farklı büyütmelerden alınan SEM görüntülerine göre, H30G30 kodlu biyo-greftin yüzeyinde poroz bir yapının oluştuğu gözlenirken, jelatinin yapıdan uzaklaşması sonucu yükseltiler şeklinde bir mikro boyutta poroz yapının oluştuğu da gözlenmektedir. X250 büyütmede yüzeyde yoğun bir şekilde poroz yapının oluştuğu, X1000 büyütmede ise düz alanlarda sıvı faz sinterlenmesine bağlı olarak tane sınırlarının net görülmediği ve homojen olarak yayılan bir poroz yapının oluştuğu belirlenmiştir.



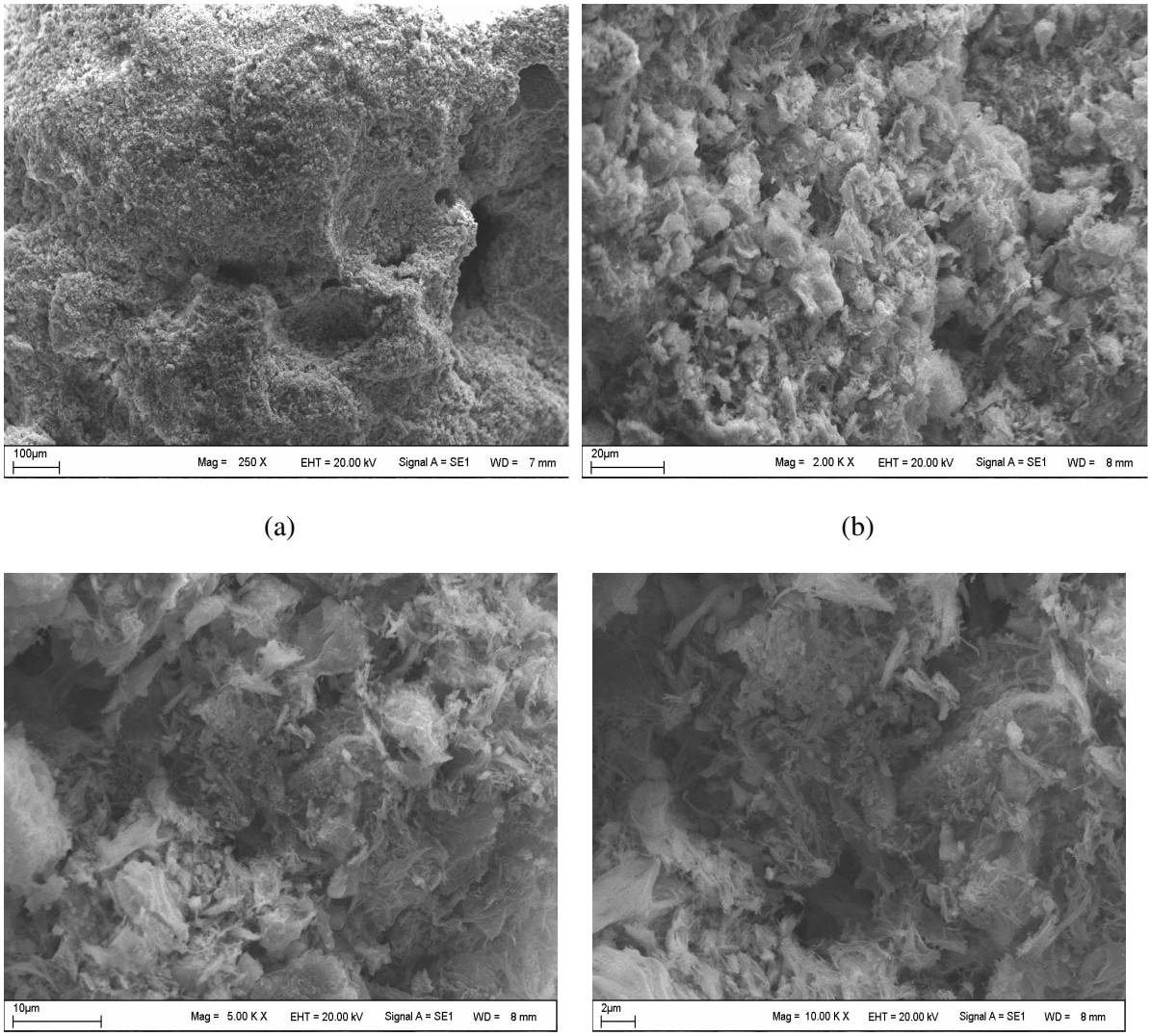
(a)

Element	C	O	Na	P	Ca	Si	K
%Ağırlık	2.55	41.73	3.36	16.39	21.03	0.32	13.29
%Atomik Ağırlık	4.85	59.49	3.33	12.07	11.97	0.26	7.75

(b)

Şekil 4.87. H30G30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

HA esaslı ve %30 jelatin içerikli (H30G30 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.87 (a-b)'de verilmektedir. EDX analiz sonucu, H30G30 kodlu biyo-greftin yüksek oranda Ca, P, K ve O iyonlarını ve düşük miktarda da Na ve Si iyonlarını içerdiği görülmektedir. H30G20 kodlu biyo-greft H30G30 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında, H30G30 kodlu biyo-greftin Mg iyonu içermediği, fakat H30G20 kodlu biyo-greftten farklı olarak Na ve Si iyonları içerdiği EDX analiz sonucunda tespit edilmektedir. Ayrıca H30G30 kodlu biyo-greftteki Ca, P ve O miktarının H30G20 kodlu biyo-greftten düşük olduğu da belirlenmektedir.

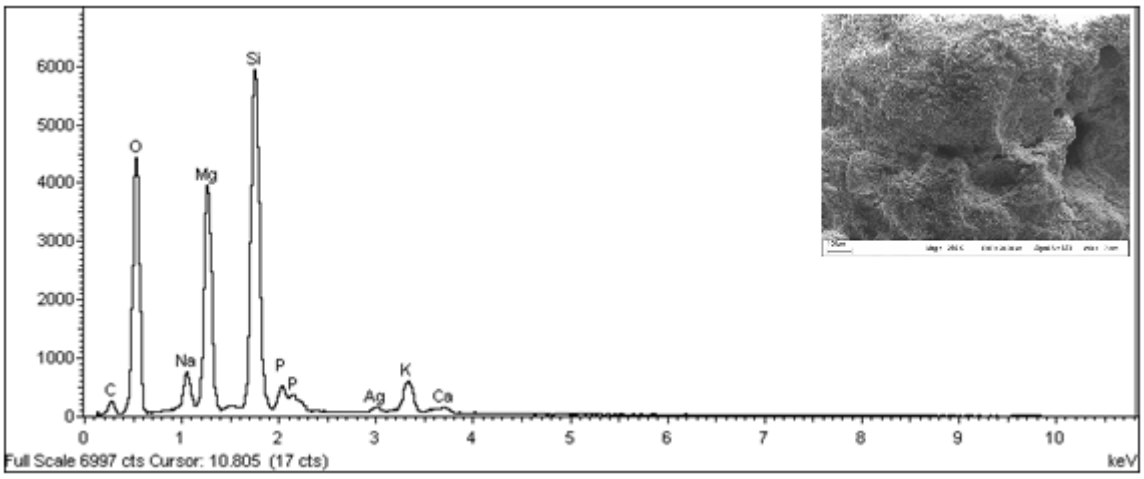


Şekil 4.88. H30G40 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X2000, (c) X5000 ve (d) X10000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Doku mühendisliği, ilk olarak 1980'li yılların ikinci yarısında bilim adamları tarafından gündeme getirilmiş ve takip eden yıllardan günümüze kadar gelen süre zarfında da biyomedikal alanda hızlı bir gelişime olanak sağlamıştır. Doku mühendisliğinde kullanılacak biyomalzemeleri doğal malzemeler, seramikler, metaller, kompozitler ve polimerik malzemeler olmak üzere beş gruba ayırabiliriz. Her ne kadar kullanılabilecek biyomalzeme yelpazesi geniş olsa da yeni bir biyomalzeme geliştirilmesinde araştırmacıların dikkat etmesi gereken özellikler biyouyumluluk, biyobozunurluk, enflamasyona neden olmama ve kullanılacak olan dokuya fiziksel ve mekanik açıdan benzer özellikler sergileme gibi birçok etken söz konusudur [250].

Bu tez çalışmasının amacı, farklı oranlarda jelatin içerikli biyo-greftlerin porozite miktarındaki farklılıkların etkilerini incelemektir. Böylece sol-jel yöntemiyle üretilen, %30 HA

esaslı ve %40 jelatin içerikli (H30G40 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.88 (a-d)'de verilmektedir. SEM görüntülerine göre, H30G40 kodlu biyo-greftin X250 büyütmesinde katmanlı ve düşük miktarda makro gözenekli (poroz) bir yapının oluştuğu gözlenirken, X2000 büyütmede büyük porların yanında oluşan küçük porlarda görülmektedir (Şekil 4.88(a-b)). Yüzeyden alınan büyütmeler arttıkça (X5000 ve X10000 büyütmede) farklı boyutlarda küresel şekildeki porlar daha net bir şekilde gözlenmektedir.



(

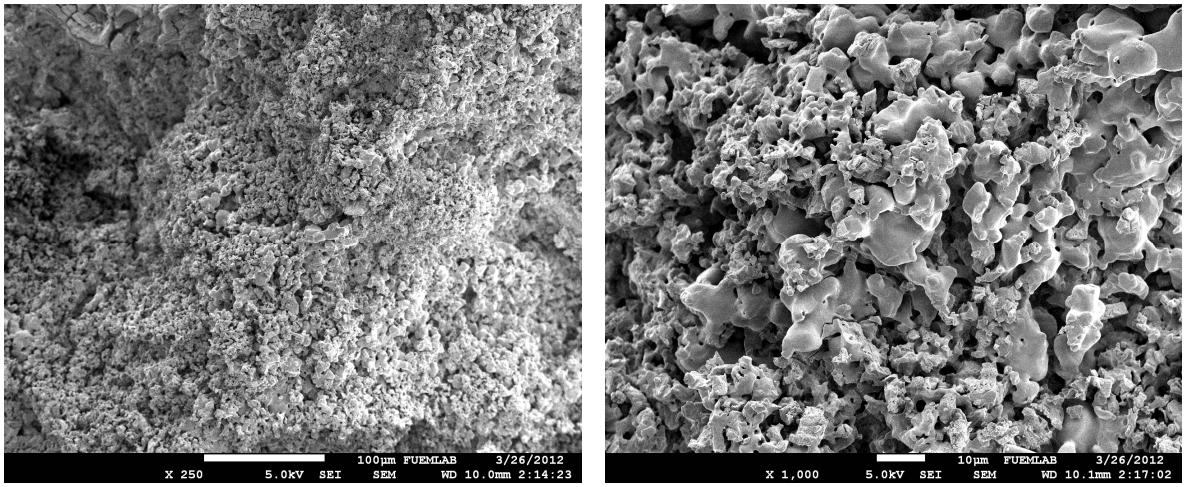
a)

Element	C	O	Mg	P	Ca	Si	Ag	Na
%Ağırlık	3.73	47.44	14.07	1.69	0.75	23.89	1.48	2.70
%Atomik Ağırlık	6.19	59.09	11.53	1.09	0.37	16.95	0.27	2.34

(b)

Şekil 4.89. H30G40 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

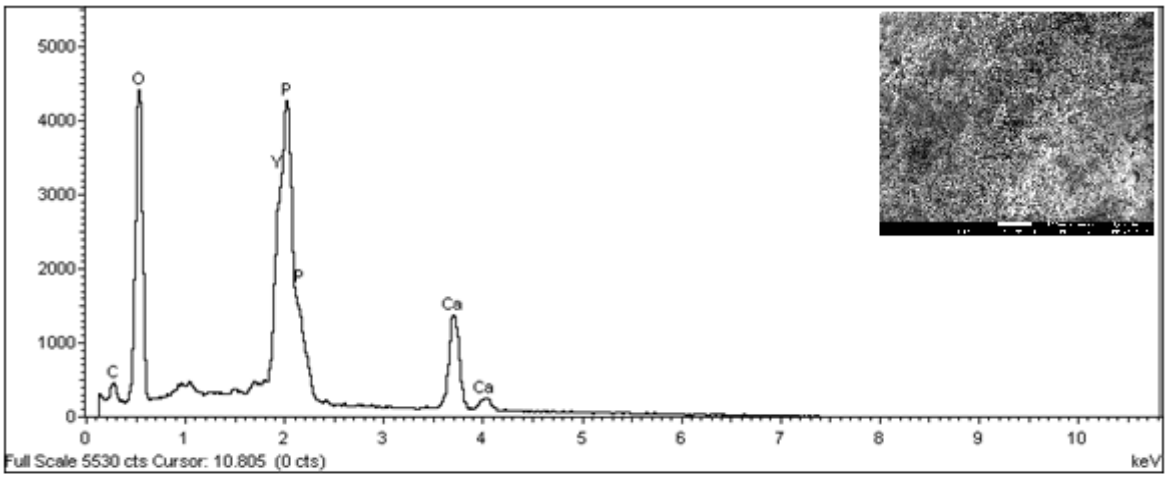
HA esaslı ve %40 jelatin içerikli (H30G40 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede genel olarak alınan EDX spektrumu Şekil 4.89'da verilmektedir. EDX analiz sonucu, H30G40 kodlu biyo-greftin yüksek oranda O, Mg ve Si iyonlarını ve düşük oranda da C, P, Ca, Ag ve Na iyonlarını içerdiğini göstermektedir. H30G20 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında, H30G40 kodlu biyo-greftin Ag, Na ve Si iyonlarını içerdiği EDX analiz sonucunda tespit edilmektedir. Ayrıca H30G40 kodlu biyo-greftte element miktarlarının H30G20 kodlu biyo-grefte göre düşük olduğu da Şekil 4.89'da görülmektedir. H30G30 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında ise, H30G40 kodlu biyo-greftin H30G30 kodlu biyo-greftten farklı olarak Mg ve Ag iyonlarını içerdiği ve O iyonu hariç diğer bütün iyonların miktarının düşük olduğu belirlenmektedir.



(a) (b)

Şekil 4.90. H10G75 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Kemik oluşumu ve kırık iyileşmesi, birçok büyüme faktörü ve hormonla birlikte biyo-aktif moleküller tarafından kontrol edilen karmaşık bir süreçtir. Örnek olarak; kemikte kırık oluştuğun da sitokin ve büyüme faktörleri, osteoprogenitör hücrelerin hasarlı bölgeye göç etmesini ve osteoblastlara farklılaşmasını sağlayıp, hücre üremesini ve ECM üretimini kontrol etmektedir [227]. Transforme edici büyüme faktörü (TGF-β), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi büyüme faktörleri osteoblast farklılaşmasını düzenleyen faktörlerdir. Kalsitonin, parathormon, aktif Vitamin D metabolitleri, leptin ve heparan sülfat ise kemik oluşumunu düzenleyen endokrin faktörlerdir. Bunlara ek olarak kemik morfogenetik proteinler (BMP) gibi sitokinler ve dekzametazon gibi glukokortikoidler de kemik oluşumunda ve gelişimde çeşitli roller üstlenmektedir [228]. Kemik kırıklarının iyileşmesinde kemiğin fiziksel yapısıda bir diğer önemli özellik olup ürettiğimiz greftler kemik kırık bölgesine yerleştirildiğinde hücrelerin büyümesini kolaylaştırması için poroz yapıda üretilmiştir. Şekil 4.90 (a-b) %10 HA esaslı ve %75 jelatin içerikli (H10G75 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki morfolojik (SEM) görüntüsünü vermektedir. X250 büyütmede H10G75 kodlu biyo-greftin yoğun bir poroz yapıya sahip olduğu görülürken, X1000 büyütmede porların boyutlarının değişken olduğu ve porlar arasındaki bağın güçlü olduğu görülmektedir (Şekil 4.90(a-b)). HA esaslı ve %10-75 oranları arasında jelatin katkılı biyo-greftler kıyaslandığında, jelatin miktarı arttıkça porların boyutlarının ve miktarının arttığı, fakat taneler arası bağların zayıfladığı belirlenmiştir.



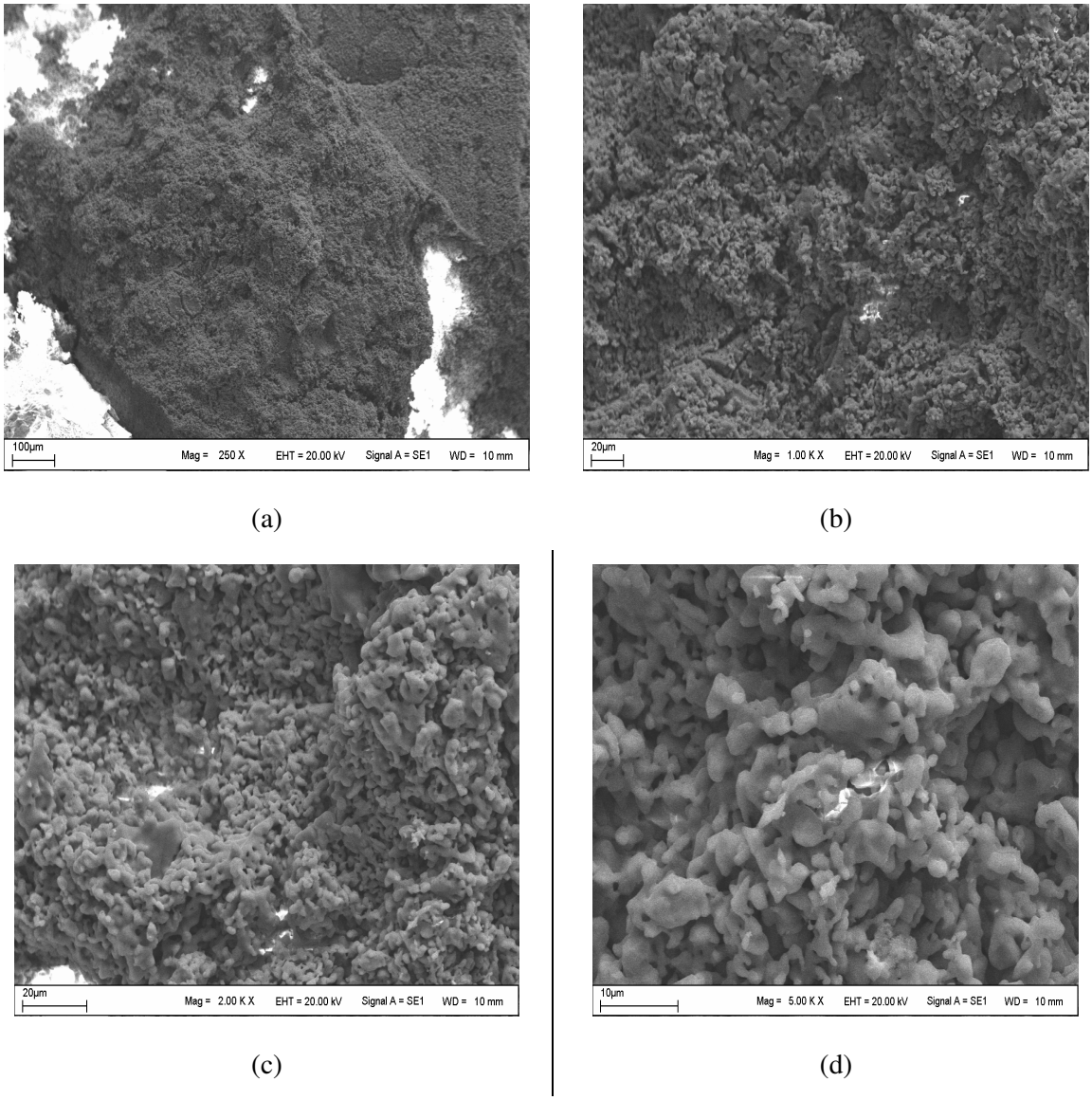
(a)

Element	C	O	Y	P	Ca
%Ağırlık	9.75	54.80	17.09	9.15	9.62
%Atomik Ağırlık	15.78	69.46	3.90	5.99	4.87

(b)

Şekil 4.91. H10G75 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

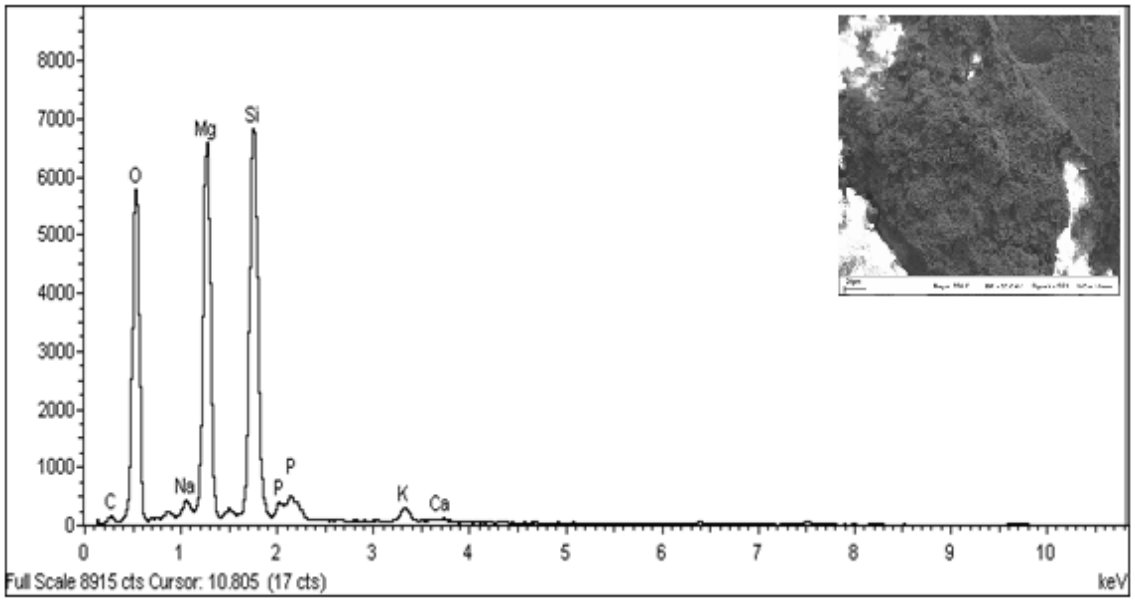
H10G75 kodlu biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.91(a-b)'de verilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde, H10G75 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünden genel ve yoğun bir poroz yapının elde edildiği ve EDX sonuçlarına göre de yapıda C, O, Y, P ve Ca iyonlarına bağlı bileşiklerin oluştuğu görülmektedir. Ayrıca EDX spektrumuna göre, yapıdaki O miktarının en yüksek değerde olduğu ve düşük miktarda da C içeriğine sahip olduğu tespit edilmektedir.



Şekil 4.92. S30G20 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X1000, (c) X2000 ve (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü.

Sübye kemiği esaslı ve %20 jelatin katkılı (S30G20 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.92 (a-d)'de verilmektedir. Sübye kemiği içerikli ve poroz yapıya sahip S30G20 kodlu biyo-greftin poroz yapısını tam olarak görebilmek için sol-jel yöntemiyle üretildikten sonra kurutulup praslenmemiştir. Bunun yerine jel halinde dairesel kalıplara dökülerek şekillendirilmiş ve yapıdaki jelatini uzaklaştırıp poroz yapı elde etmek için önce oda sıcaklığında yaşlandırılmış, daha sonra da fırında kademeli olarak (önce 120 ºC ve sonra 500ºC'de) kurutulmuştur. Bu nedenle kurutma işlemi sırasında yüzeyden nem ve jelatin uzaklaşırken numune yüzeyinde yükseltiler meydana gelmiştir. X250 büyütmede bu yükseltiler görülürken, S30G20 kodlu biyo-greftin poroz yapıya sahip olduğu da görülmektedir (Şekil 4.92 (a)). X1000 büyütmede poroz boyutlarının değişken olduğu, küçük porların yanında büyük

porlarında oluştuğu tespit edilmektedir. Ayrıca sıvı faz sinterlenmesinde ara bölgelerde oluşan küçük porozların kümeleşme şeklinde oluştuğu da net olarak görülmektedir (Şekil 4.92 (b)). X2000 ve X5000 büyütmelerde tanelerin heterojen bir şekilde dağıldığı ve yoğun bir poroz yapının oluştuğu Şekil 4.92 (c-d)'de belirlenmiştir.



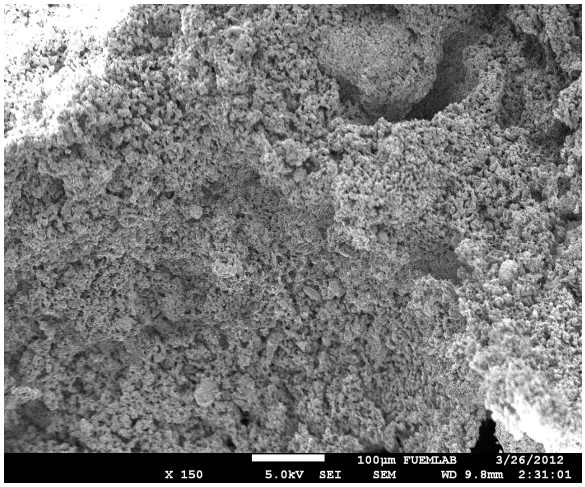
(a)

Element	C	O	Si	Na	Mg	P	K
%Ağırlık	2.23	48.76	25.27	0.98	20.41	0.49	1.47
%Atomik Ağırlık	3.65	60.02	17.72	0.84	16.53	0.31	0.74

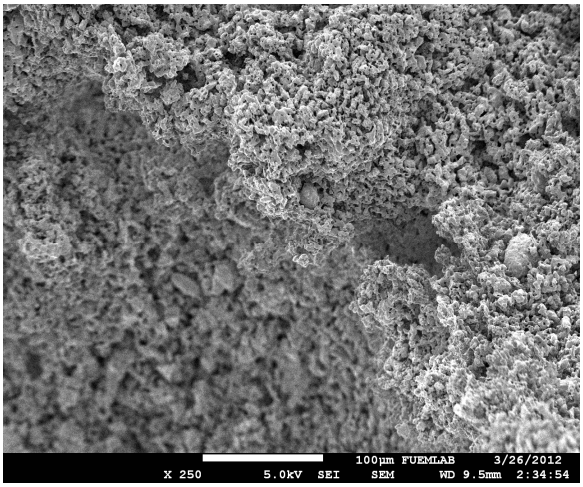
(b)

Şekil 4.93. S30G20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

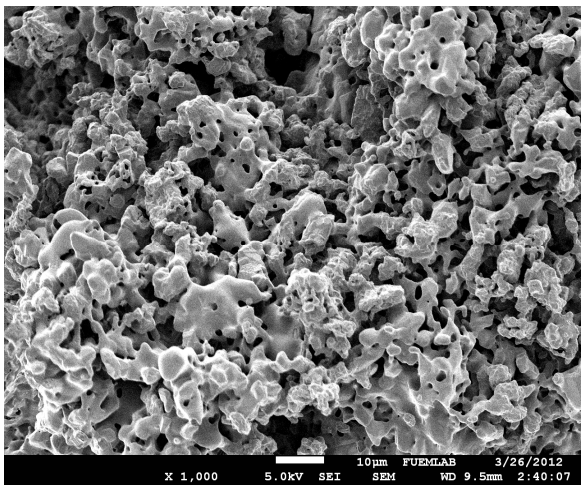
$CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli sübye kemiği esaslı ve %20 jelatin katkılı (S30G20 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmeden alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.93(a-b)'de verilmektedir. Sonuçta, S30G20 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünden farklı boyutlarda poroz yapının elde edildiği ve EDX sonuçlarına göre de yapıda C, O, Si, P,Na, Mg ve K iyonlarına bağlı bileşiklerin oluştuğu görülmektedir. Ayrıca EDX analiz sonucuna göre, yapıdaki O miktarının en yüksek %ağırlık değerine sahip olduğu ve en düşük değerde de P içeriğine sahip olduğu tespit edilmektedir.



(a)



(b)

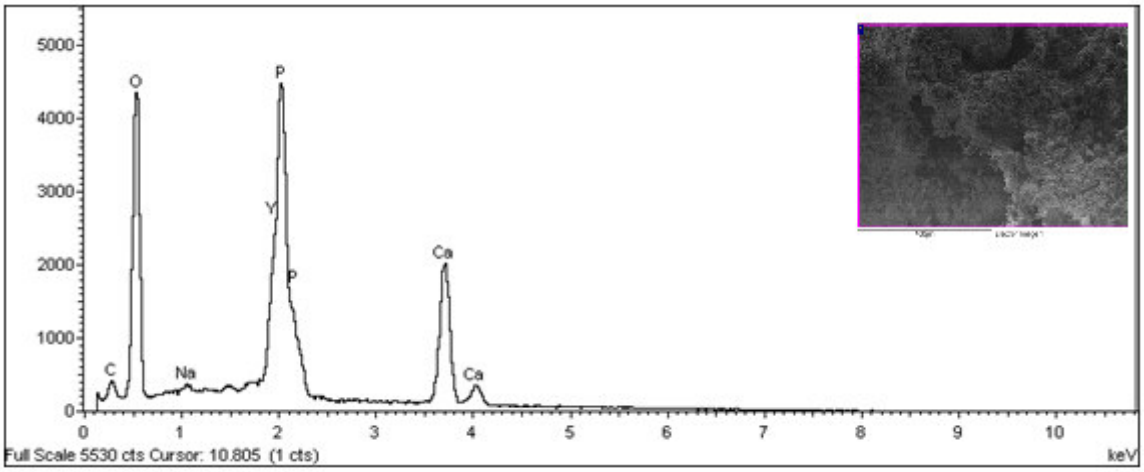


(c)

Şekil 4.94. S30G30 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X150, (b) X250 ve (c) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Yapılan çalışmada, HA dışında $CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli doğal ürünlerden biri olan sübye kemiği kullanılarak doğal ürünlerin hem kemik onarımında etkisi incelenmiş hemde HA, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftlerle kıyaslanmıştır. Bunun için %13-30 oranları arasında sübye kemiği ile %20-75 oranları arasında jelatin kullanılarak poroz greftler üretilmiştir. Sübye kemiğinin dışında yapıya $NaCO_3$, P_2O_5, KH_2PO_4 ve Y_2O_3 gibi bileşikler ilave edilerek jelleşme, sinterlenebilirlik, mekanik özellikler ve biyouyumluluk özellikleri arttırılmaya çalışılmıştır. Şekil 4.94 (a-c) ağırlıkça %30 oranında sübye kemiği esaslı ve %30 oranında jelatin içerikli (S30G30 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsünü vermektedir. X150 ve X250 büyütmede S30G30 kodlu biyo-greftin genel ve yoğun bir poroz yapıya sahip olduğu ve porların boyutunun küçük olduğu görülürken, X1000 büyütmede porların şekillerinin dairesel olduğu ve

porlar arasındaki bağlantının güçlü olduğu Şekil 4.94 (a-c)'de gözlenmektedir. S30G30 kodlu biyo-greft ile S30G20 kodlu biyo-greft kıyaslandığında, S30G30 kodlu biyo-greftin küçük porların yanında oluşan büyük porların boyutlarının daha büyük olduğu ve jelatin miktarı arttıkça por çapının arttığı belirlenmiştir.



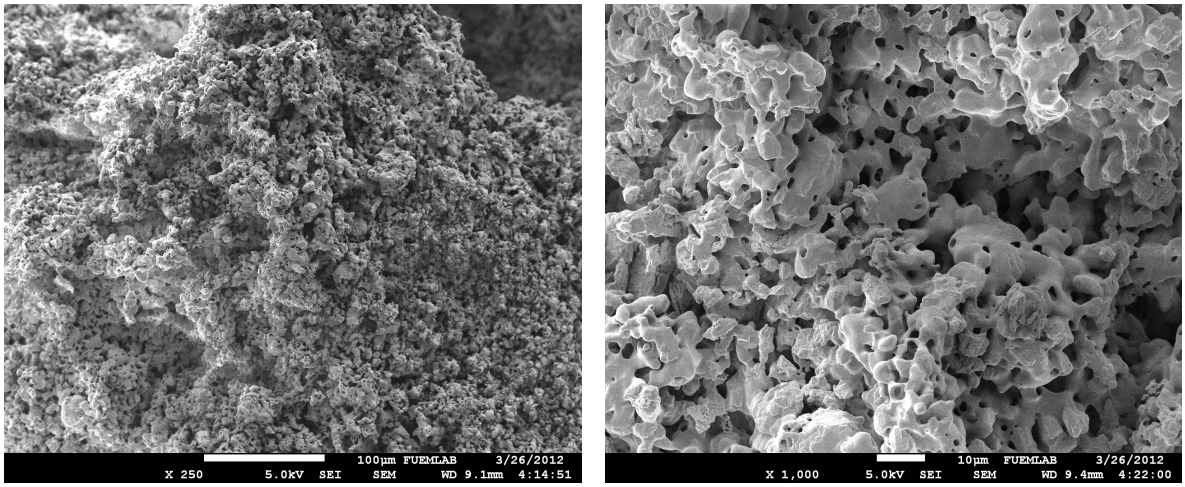
(a)

Element	C	O	Ca	Na	Y	P
%Ağırlık	8.68	55.33	14.31	0.43	8.83	12.43
%Atomik Ağırlık	14.29	68.38	7.06	0.37	1.96	7.93

(b)

Şekil 4.95. S30G30 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

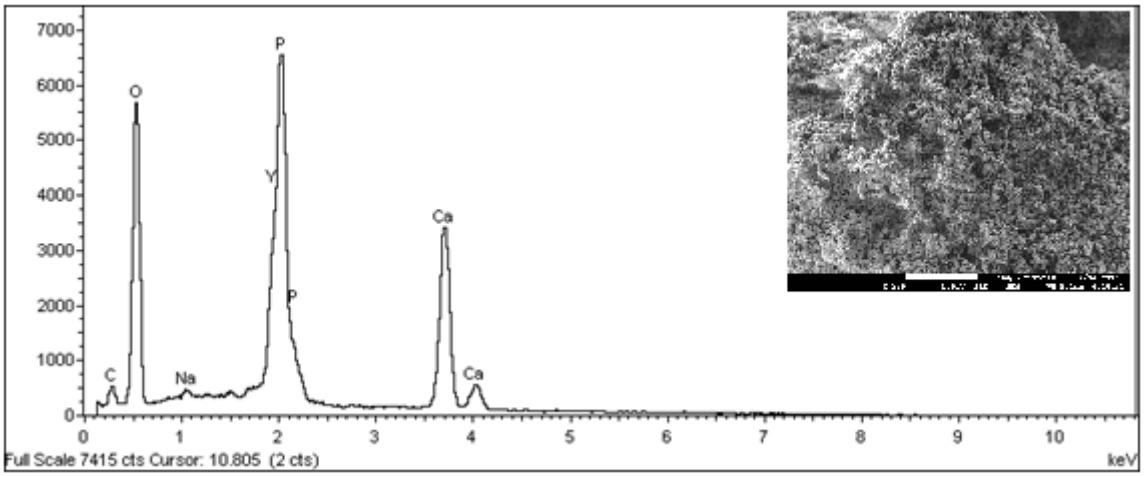
Sübye kemiği (Ağırlıkça %30 oranında) esaslı ve %30 oranında jelatin içerikli (S30G30 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX analiz spektrumu Şekil 4.95 (a-b)'de verilmektedir. S30G20 kodlu biyo-greftin EDX sonuçları S30G30 kodlu biyo-greftin EDX sonuçları ile kıyaslandığında, benzer sonuçlar verdiği görülmektedir. Böylece S30G30 kodlu biyo-greftte S30G20 kodlu biyo-greftte olduğu gibi Ca, O, C, Na, Y ve P iyonlarına bağlı bileşiklerin oluştuğu belirlenmektedir. Ayrıca EDX sonuçlarına göre Ca, O ve P miktarının yüksek ve C, Y ve Na miktarının ise düşük olduğu gözlenmektedir.



(a) (b)

Şekil 4.96. S13G75 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü**.**

Sübye kemiği; $CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli olup, dünyanın birçok yerinde kolayca bulunabilen, ucuz, düşük sıcaklıklarda bile HA'e kolayca dönüşebilen bir doğal element olmanın yanında, 1350ºC'nin üzerindeki sıcaklıklarda bile HA'in termal dengesini koruyabilen, sinterleme sonrası poroz yapısı bozulmayan, optimal por boyutuna ve porlar arasındaki güçlü arabağlantıya sahip olduğu için doku büyümesi gibi fizikolojikal aktiviteleri geliştirmektedir[46]. Ayrıca, in vitro testlerinde yüksek biyoaktifliğe sahip, osteoblastlarla çok iyi biyouyumluluk gösteren doğal bir üründür[46]. Bu nedenlerden dolayı, kullandığımız sübye kemiğine farklı oranlarda jelatin ilave edilerek poroz yapı elde edilmeye çalışılmıştır. Şekil 4.96 (a-b) %13 sübye kemiği esaslı %75 jelatin içerikli (S13G75 kodlu) biyo-greftten farklı büyütmelerde alınan SEM görüntülerini vermektedir. SEM görüntülerinden S13G75 kodlu biyo-greftte mikroporoz yapının elde edildiği görülmektedir. Ayrıca X250 büyütmede biyo-greftin makroporlara sahip olmasının yanında, yoğun ve homojen bir mikroporoz yapıya sahip olduğu da görülmektedir. X1000 büyütmede ise, mikroporların dairesel şekilde olduğu ve mikroporlar arasındaki arabağlantının güçlü olduğu Şekil 4.96 (a-b)'de gözlenmektedir.



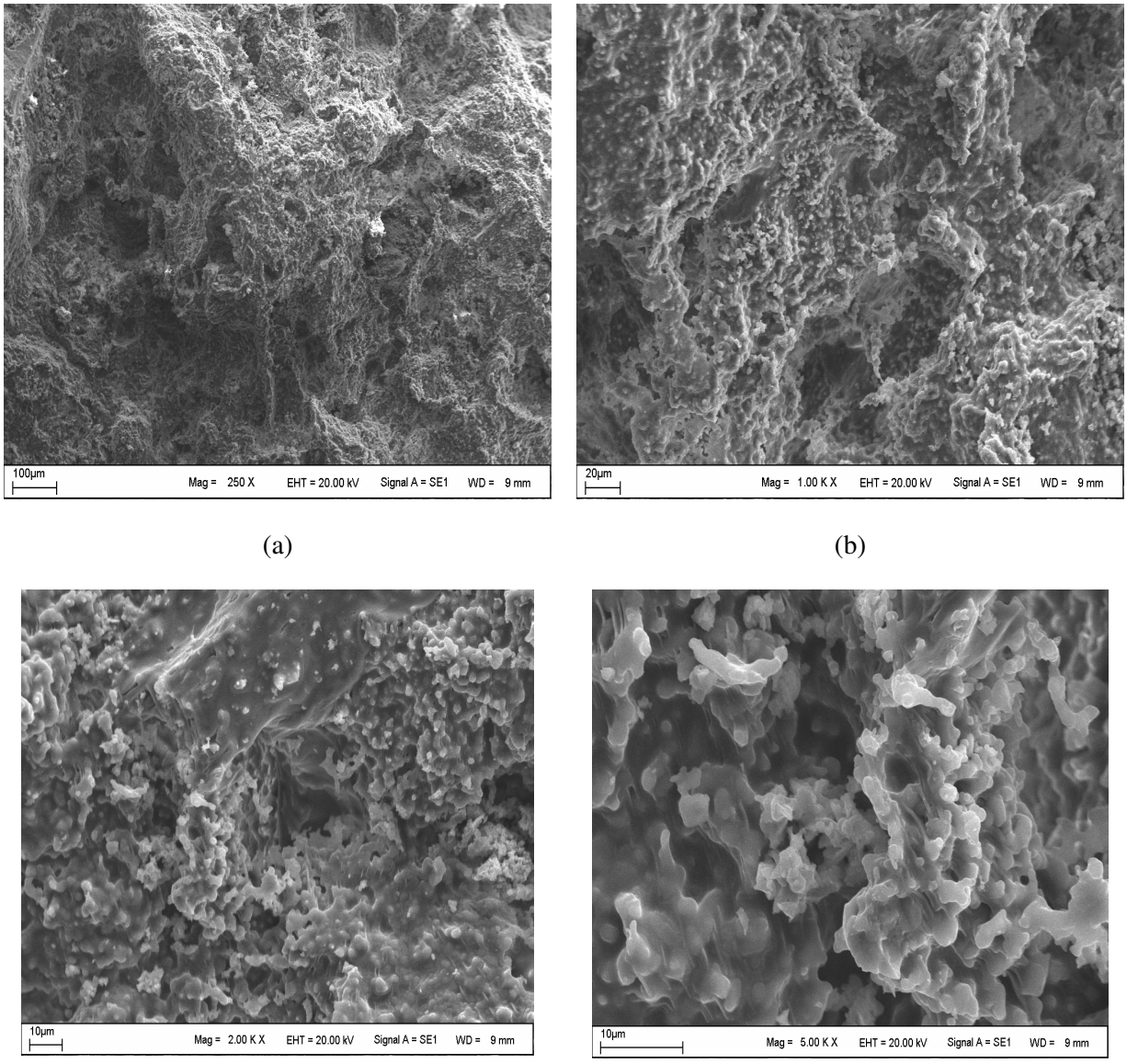
(a)

Element	C	O	Ca	Na	P	Y
%Ağırlık	7.83	51.76	16.49	0.38	13.07	10.46
%Atomik Ağırlık	13.42	66.64	8.48	0.34	8.69	2.42

(b)

Şekil 4.97. S13G75 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

Sübye kemiği esaslı ve %75 jelatin içerikli (S13G75 kodlu) biyo-greftin genel olarak yüzeyinden alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.97 (a-b)'de verilmektedir. S13G75 kodlu biyo-greftin SEM görüntülerinden, poroz bir yapıya sahip olduğu görülürken, EDX sonuçlarına göre de yüksek oranda Ca, O, P ve Y elementleri ve düşük oranda da C ve Na elementlerini içerdiği belirlenmektedir. Sübye kemiği ve jelatin içerikli diğer biyo-greftler ile kıyaslandığında, S13G75 kodlu biyo-greftin diğer biyo-greftlere göre benzer ve birbirine yakın oranlarda elementler içerdiği tespit edilmiştir. Bütün sübye kemiği ve jelatin içerikli biyo-greftler de Ca, O, P ve Y iyonlarının oranı yüksek, C ve Na iyonlarının oranı da düşüktür.

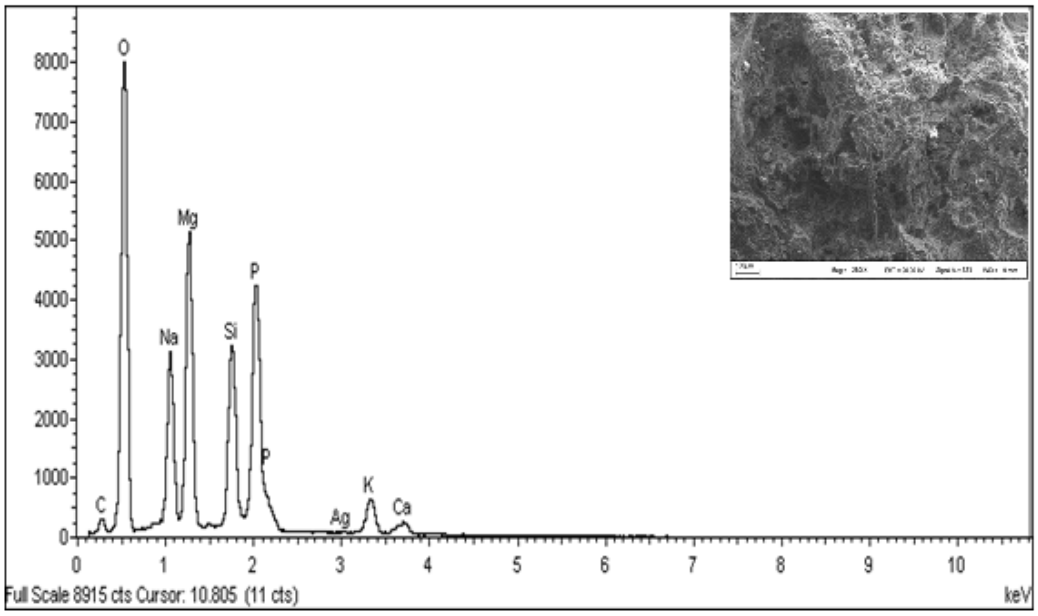


Şekil 4.98. L40G20 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X1000, (c) X2000, (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Lületaşı çok değişik sektörlerde farklı amaçlar için kullanılmaktadır [251,252]. Örneğin, ilaç üretim sanayinde dolgu malzemesi, renk giderici madde, sigara filtreleri, deterjan ve temizlik malzemeleri, boyalarda ve seramik üretiminde kullanıldığı gibi, pansuman malzemesi olarak kullanılabileceği söylenmektedir [251-253]. Ancak lületaşı birçok alanda kullanılırken, kemiklerin onarımında kullanılabilirliği henüz araştırılmamıştır. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmada, kemiğin kimyasal yapısına benzer elementler içeren ve poroz yapıya sahip olan lületaşının kemik dolgu malzemesi olarak kullanılabilirliği araştırılırken, poroz yapıya sahip olursa kemik

onarımında sağlayacağı katkılar ve imkanlar incelenmiştir. Bunun için %10-40 oranları arasında lületaşı ve %20-75 oranları arasında da jelatin içerikli poroz yapıya sahip kemik greftleri sol-jel yöntemiyle üretilmiştir.

Şekil 4.98 (a-d) ağırlıkça %40 lületaşı esaslı %20 jelatin içerikli (L40G20 kodlu) biyo-greftin X250-X5000 büyütmeler arasındaki SEM görüntülerini verilmektedir. Şekil 4.98(a)'da verilen X250 büyütmede L40G20 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünden makroporlara sahip olduğu gösterilmektedir. X1000 büyütmede, yüzeyde oluşan makroporlar daha net görülürken, porları bağlayan arabağlantıların kuvvetli bir bağ oluşturduğu ve yüzeyde normal matris yapısından farklı apatit tanelerinin oluştuğu da tespit edilmektedir (Şekil 4.98 (b)). X2000 ve X5000 büyütmede ise, makroporlar ve yüzeyde oluşan apatit taneleri daha net görülürken, makroporların yanında, oluşan mikroporlar belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.98 (c,d)).



(a)

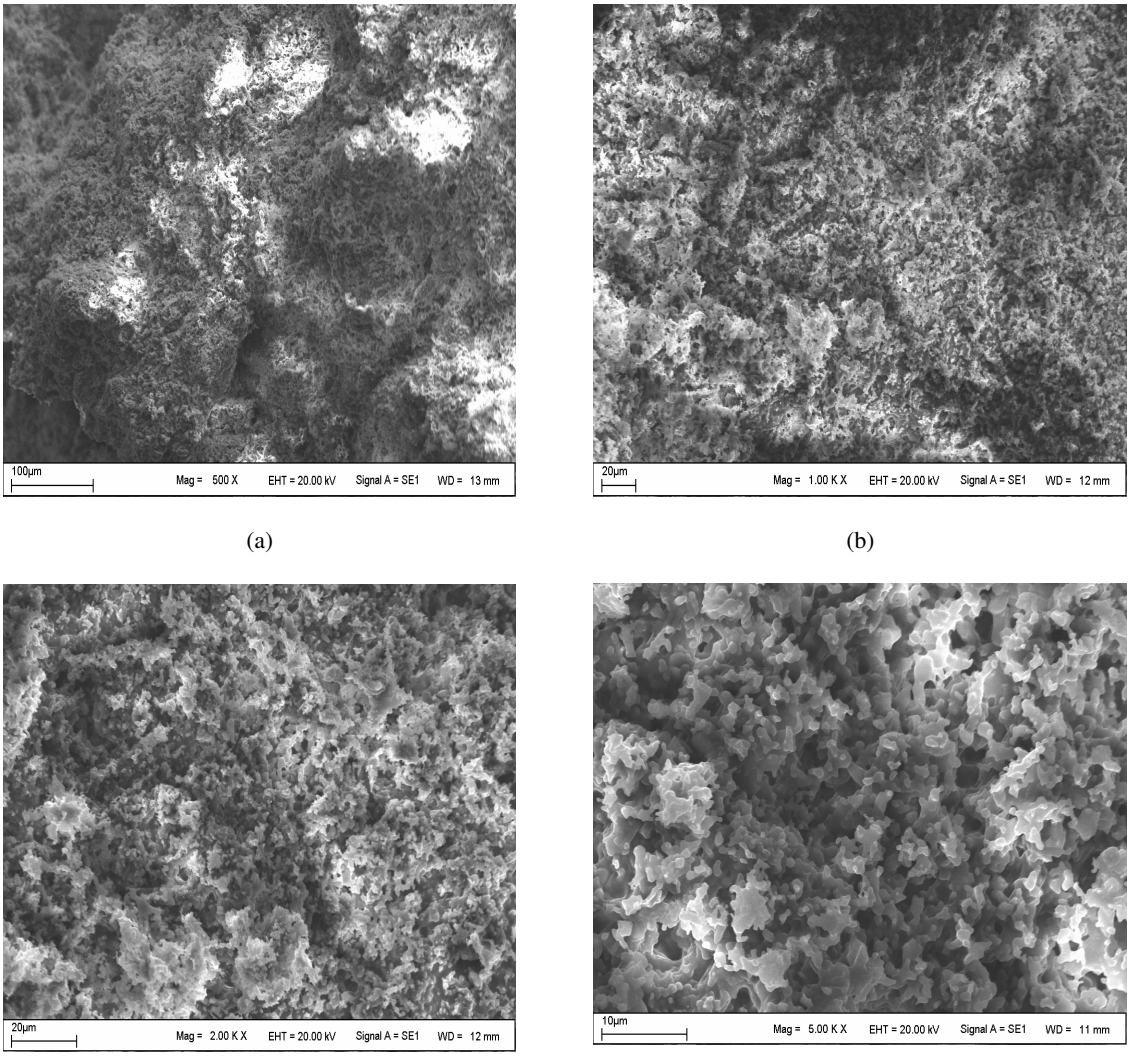
Element	C	O	Ca	Na	P	Si	Mg	Ag
%Ağırlık	2.65	50.42	0.99	8.26	13.83	8.11	12.69	0.12
%Atomik Ağırlık	4.34	61.92	0.49	7.06	8.78	5.68	10.25	0.02

(b)

Şekil 4.99. L40G20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmedeki EDX spektrumu

Lületaşı esaslı ve %20 jelatin içerikli (L40G20 kodlu) biyo-greftin EDX analiz spektrumları Şekil 4.99'da verilmektedir. L40G20 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünden numunenin makroporlara sahip olduğu görülürken, EDX analiz spektrumlarından numunenin C, O, Ca, Na, P,

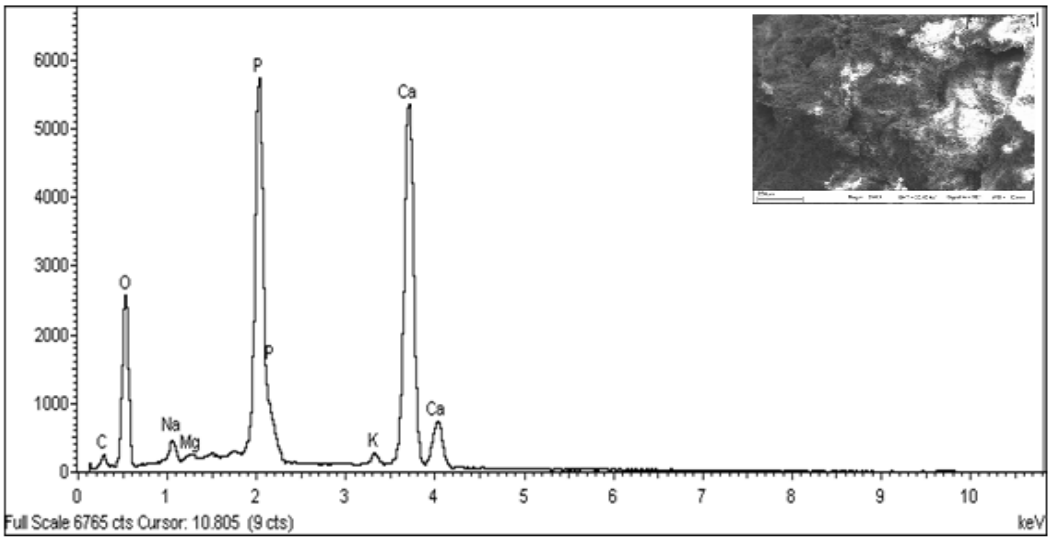
Si, Mg ve Ag iyonlarını içeren bileşiklere sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca yüzeyde en fazla P, Si, Mg, Na ve O elementlerine ve en az miktarda da C, Ca, Ag elementlerine bağlı bileşiklerin oluştuğu tespit edilmektedir.



Şekil 4.100. L40G30 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X500, (b) X1000, (c) X2000 ve (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Lületaşı esaslı (Ağırlıkça %40 oranında) ve %30 jelatin katkılı (L40G30 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.100'de verilmektedir. Lületaşı içerikli ve poroz yapıya sahip L40G30 kodlu biyo-greftin poroz yapısını tam olarak görebilmek için sol-jel yöntemiyle üretildikten sonra kurutulup praslenmemiştir. Bunun yerine jel halinde dairesel kalıplara dökülerek şekillendirilmiş ve kurutulmuştur. Bu nedenle kurutma işlemi sırasında yüzeyden jelatin uzaklaşırken numune yüzeyinde yükseltiler meydana gelmiştir. Bunlara bağlı olarak, bütün büyütmelerde yüzeyde oluşan yükseltiler net olarak görülürken, L40G30 kodlu biyo-

greftin poroz yapıya sahip olduğu da görülmektedir (Şekil 4.100 (a-d)). X1000 ve X2000 büyütmede büyük porların yanında küçük porlarında kümeleşmiş bir şekilde oluştuğu da net olarak görülmektedir (Şekil 4.100(b-c)). X5000 büyütmede küresel şekildeki tanelerin heterojen bir şekilde dağıldığı ve yoğun bir poroz yapının oluştuğu gösterilmiştir (Şekil 4.100(d)).



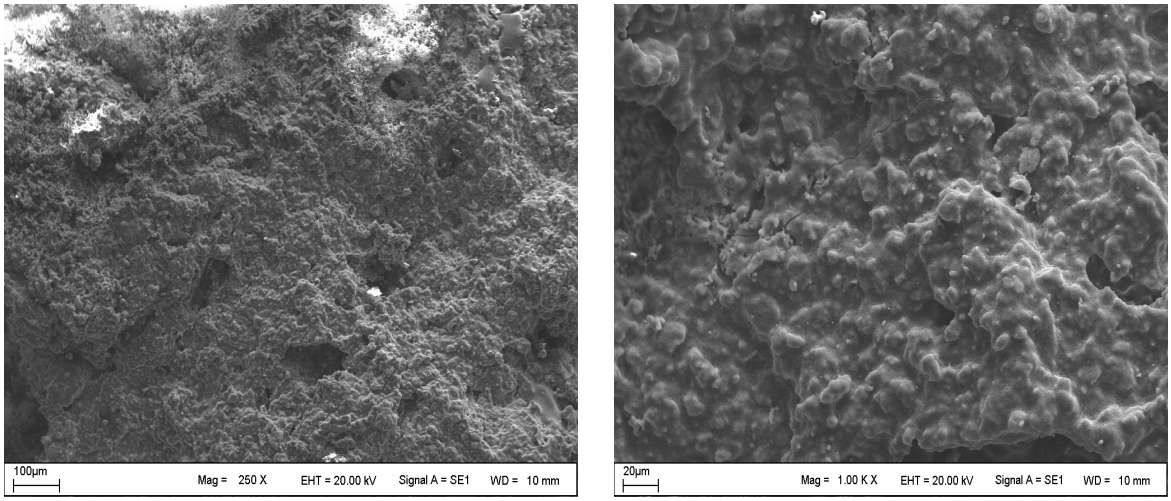
(a)

Element	C	O	Ca	Na	P	K	Mg
% Ağırlık	2.58	42.07	34.37	1.19	18.77	0.78	0.23
% Atomik Ağırlık	4.90	59.91	19.54	1.18	13.80	0.46	0.22

(b)

Şekil 4.101. L40G30 kodlu alternatif biyo-greftin EDX spektrumu

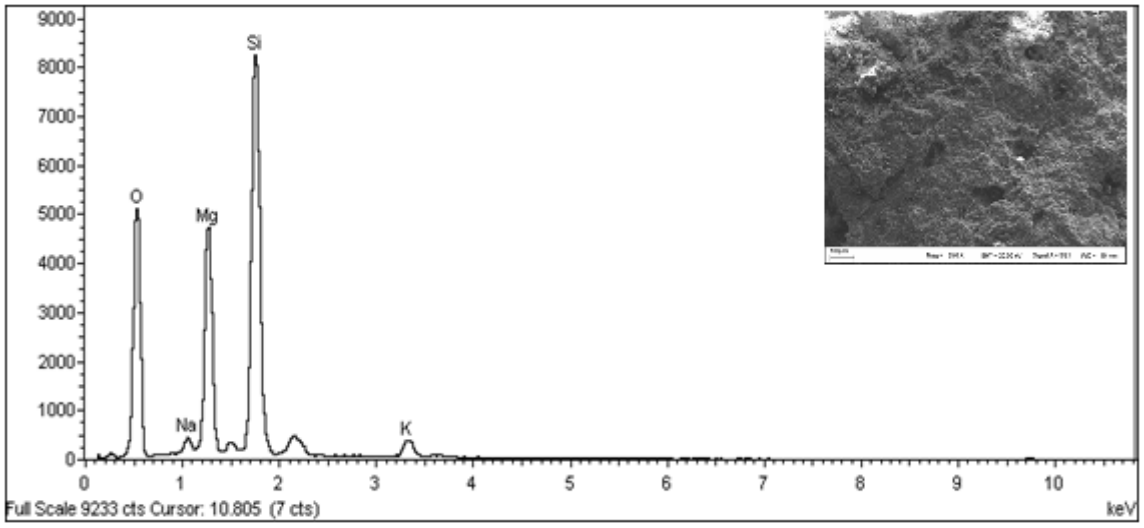
Lületaşı esaslı ve %30 jelatin içerikli (L40G30 kodlu) biyo-greftin genel olarak yüzeyinden alınan EDX analiz spektrumu Şekil 4.101'de verilmektedir. L40G30 kodlu biyo-greftin Şekil 4.101(a)'da verilen SEM görüntülerinden, poroz bir yapıya sahip olduğu görülürken, Şekil 4.101(a-b)'de verilen EDX sonuçlarına göre yüksek oranda Ca, O ve P iyonları ve düşük oranda da C, K, Mg ve Na iyonları bulunduğu görülmektedir. Lületaşı ve jelatin içerikli biyo-greftler kıyaslandığında, L40G30 kodlu biyo-grefte L40G20 kodlu biyo-greftte görülen Ag ve Si iyonlarının görülmediği ve L40G30 kodlu biyo-greftte Ca ve P iyon miktarının L40G20 kodlu biyo-greftten daha yüksek, C, O, Na ve Mg miktarının ise daha düşük olduğu belirlenmiştir.



(a) (b)

Şekil 4.102. L40G40 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Lületaşı esaslı ve %40 jelatin içerikli (L40G40 kodlu) biyo-greftin X250-X1000 büyütmeler arasındaki SEM görüntüleri Şekil 4.102 (a-b)'de verilmektedir. X250 büyütmede verilen L40G40 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünden makroporlara sahip olduğu görülmektedir. X1000 büyütmede ise, yüzeyde oluşan makroporlar daha net görülürken, porları bağlayan arabağlantıların sıvı faz sinterlemesinden dolayı tane sınırlarının belli olmadığı ve kuvvetli bir bağ oluşturduğu tespit edilmektedir (Şekil 4.102 (b)). Ayrıca X1000 büyütmede makroporların yanında oluşan mikroporlarda belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.102(b)).



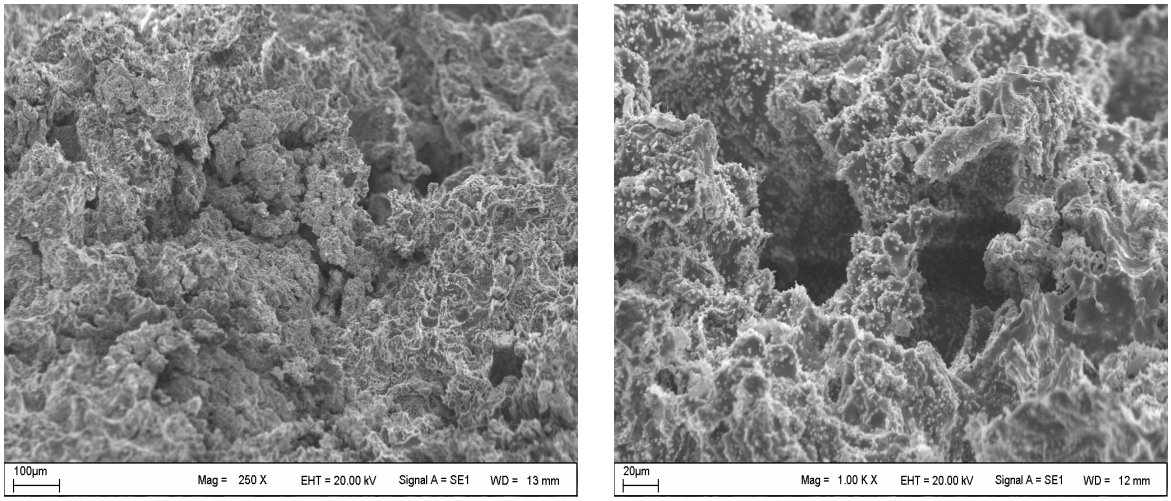
(a)

Element	Mg	O	K	Na	Si
%Ağırlık	15.75	48.61	2.53	1.16	31.94
%Atomik Ağırlık	13.12	61.52	1.31	1.02	23.03

(b)

Şekil 4.103. L40G40 kodlu alternatif biyo-greftin EDX spektrumu

Nano boyutta lületaşı esaslı ve %40 oranında jelatin katkılı (L40G40 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX analiz spektrumu Şekil 4.103(a-b)'de verilmektedir. Şekil 4.103(a)'daki SEM görüntülerinden, makroporlar etrafında sıvı faz sinterlemesine bağlı olarak belirgin olmayan tane sınırlarının oluştuğu gözlenmektedir. Ayrıca Şekil 4.103(a-b)'de verilen EDX sonuçlarına göre, L40G40 kodlu biyo-greftin yüksek miktarda Mg, O ve Si iyonları ve düşük miktarda da K ve Na iyonları içerdiği görülmektedir. L40G20, L40G30 ve L40G40 kodlu biyo-greftlerin EDX sonuçları kıyaslandığında, L40G20 kodlu biyo-greftin L40G40 kodlu biyo-greftte göre, daha düşük oranda Mg ve Si iyonlarını, yüksek miktarda da O ve Na iyonlarını içerdiği gözlenmektedir. Ayrıca L40G40 kodlu biyo-greftin bütün iyonlarının (Mg, O, K ve Na) ağırlıkça % oranlarının L40G30 kodlu biyo-greften düşük olduğu belirlenmektedir.

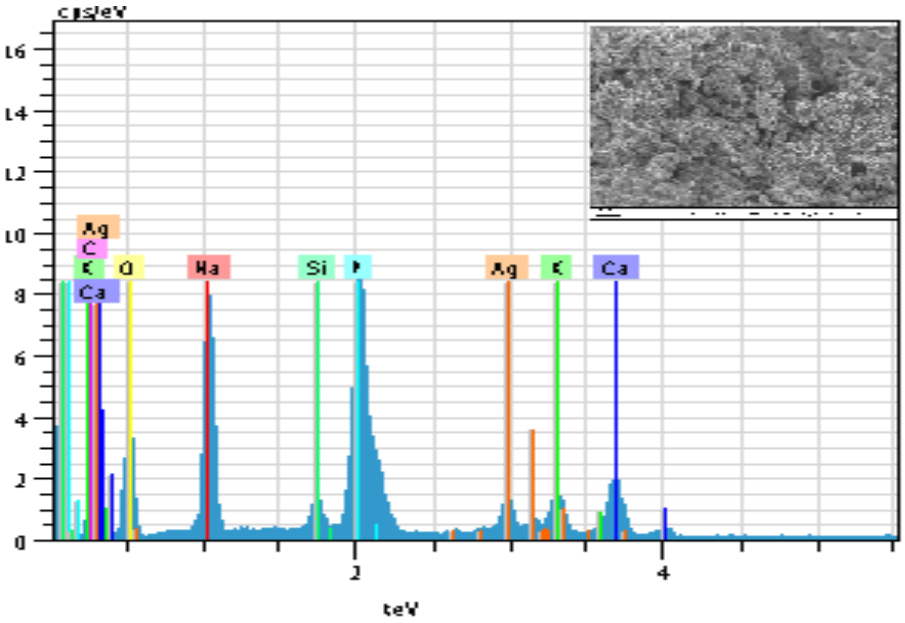


(a) (b)

Şekil 4.104. L10G75 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Lületaşı esaslı ve %75 jelatin içerikli (L10G75 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü Şekil 4.104 (a-b)'de verilmektedir. X250 büyütmede L10G75 kodlu biyo-greftin makroporoz yapıya sahip olduğu görülürken, X1000 büyütmede porların derinliğinin yüksek ve

birbirlerine güçlü bağlarla bağlı olduğu net bir şekilde gözlenmektedir (Şekil 4.104(a-b)). Lületaşı esaslı %10-75 jelatin katkılı biyo-greftler kıyaslandığında, jelatin miktarı arttıkça porların boyutlarının arttığı, fakat taneler arası bağların zayıfladığı tespit edilmiştir.



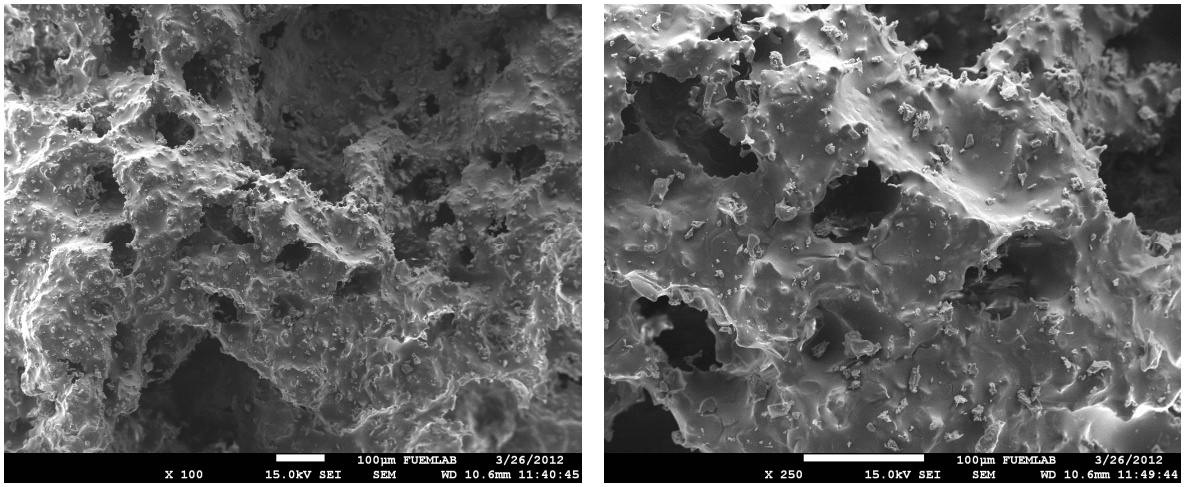
(a)

Element	C	O	P	Ca	K	Na	Ag	Si
%Ağırlık	5.60	48.23	14.40	6.14	3.36	13.03	8.46	0.77
%Atomik Ağırlık	9.60	62.05	9.57	3.15	1.77	11.67	1.62	0.57

(b)

Şekil 4.105. L10G75 kodlu alternatif biyo-greftin EDX spektrumu

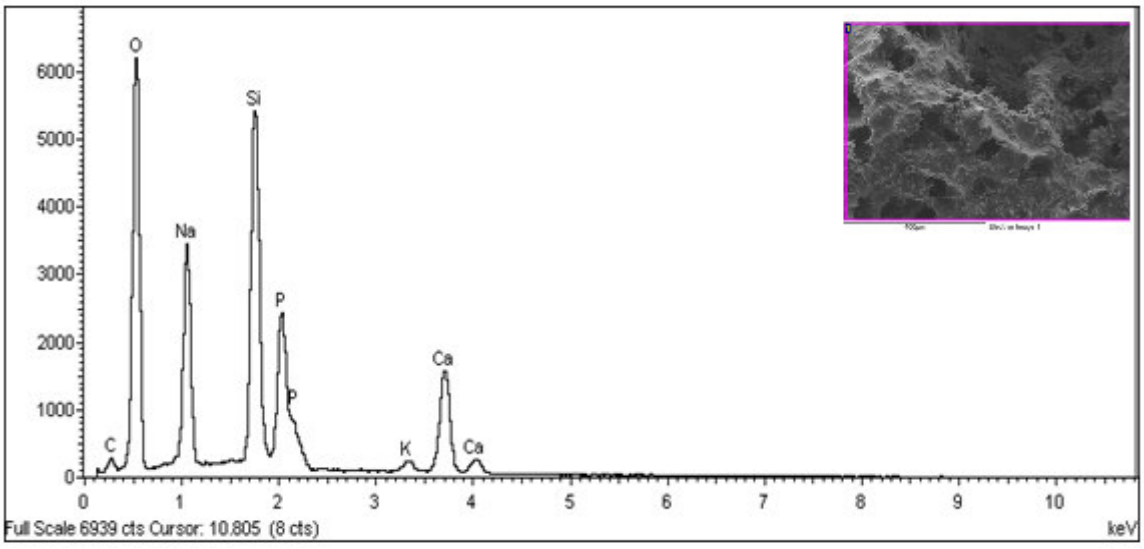
Lületaşı esaslı ve %75 jelatin içerikli (L10G75 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmeden alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.105'de vermektedir. Sonuçlar incelendiğinde, L10G75 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünden büyük bir por yapının elde edildiği, EDX sonuçlarına göre de yapıda C, O, K, Na, Ag, Si, P ve Ca iyonlarına bağlı bileşiklerin oluştuğu görülmektedir. Ayrıca yapıdaki O, Ca, P, Na ve Ag miktarının yüksek ve C, K ve Si miktarının düşük olduğu belirlenmiştir.



(a) (b)

Şekil 4.106. B40G20 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X100 ve (b) X250 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Cam-Seramikler silika (SiO_2) temelli olup Lityum / Alüminyum veya Magnezyum / Alüminyum kristalleri içeren camlardır. Biyocamda ise silika gruplarının bazıları kalsiyum, fosfor veya sodyum ile yer degiştirmiştir (SiO_2, Na_2O, CaO, P_2O_5). Böylece doku ve implant arasında kimyasal bağlanma gerçekleşmektedir[56]. Bu kimyasal bağlanmayı sağlamak için biyocam esaslı ve poroz yapı elde etmek içinde jelatin içerikli alternatif biyo-greftler üretilmiştir. Yapılan çalışmada, %10-40 oranları arasında biyocam ve %20-75 oranları arasında da jelatin kullanılarak sol-jel yöntemiyle üretim yapılmıştır. Şekil 4.106 (a-b) ağırlıkça %40 oranında biyocam esaslı ve %20 oranında jelatin katkılı (B40G20 kodlu) biyo-greftin farklı büyütmelerdeki SEM görüntülerini vermektedir. X100 büyütmede yapıda homojen bir şekilde dağılan makro ve mikro porozlar görülürken, X250 büyütmede porlar arasındaki kuvvetli arabağlantı geçişleri ve sıvı faz sinterlemesine bağlı olarak porozlar arası bağlantılardaki tane sınırlarının net olarak seçilemediği de Şekil 4.106 (a-b)'de gözlenmektedir.



(

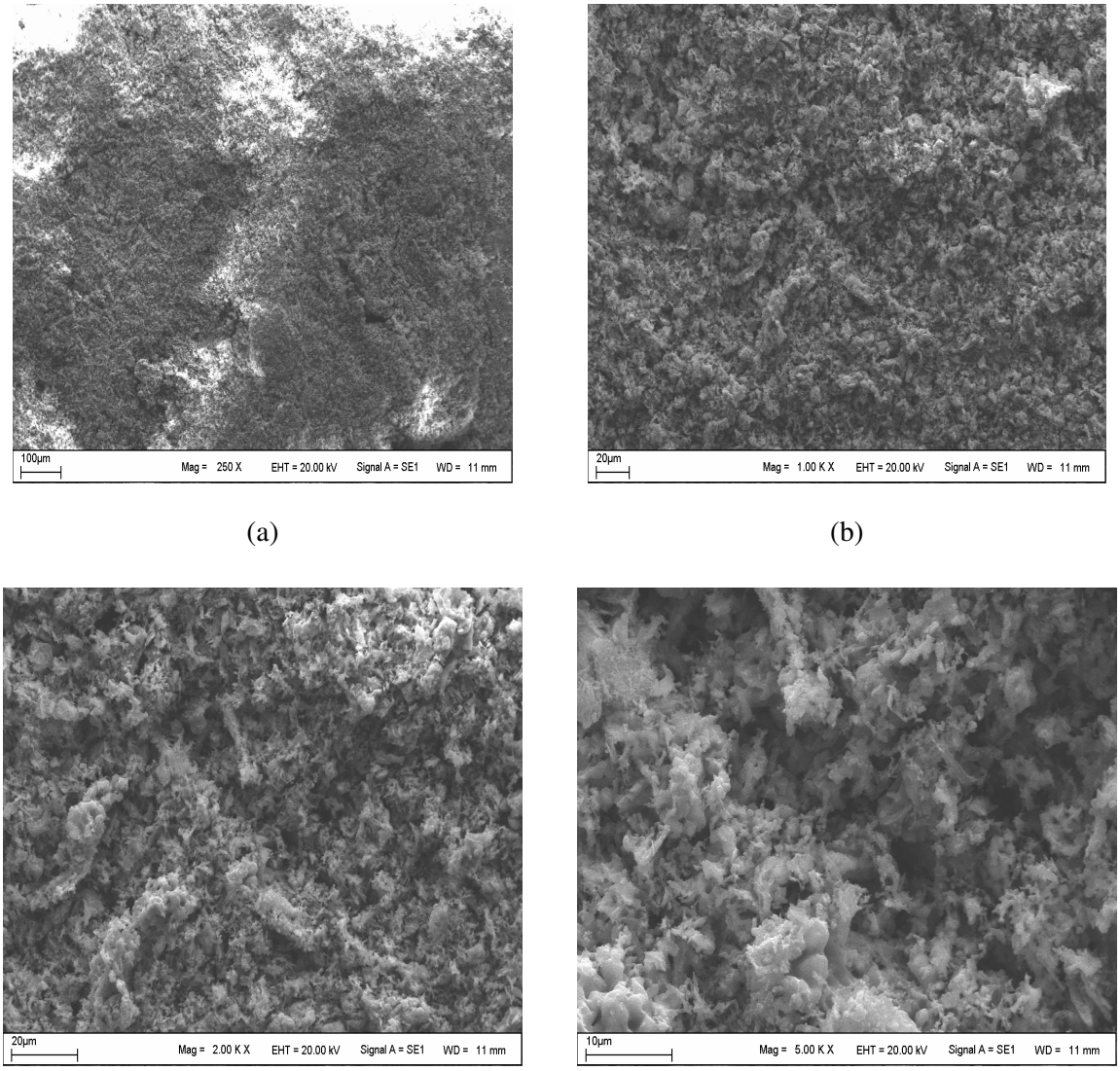
a)

Element	C	O	Na	Si	P	K	Ca
%Ağırlık	1.08	53.25	11.56	15.55	7.85	0.89	9.81
%Atomik Ağırlık	1.80	66.62	10.07	11.08	5.07	0.46	4.90

(b)

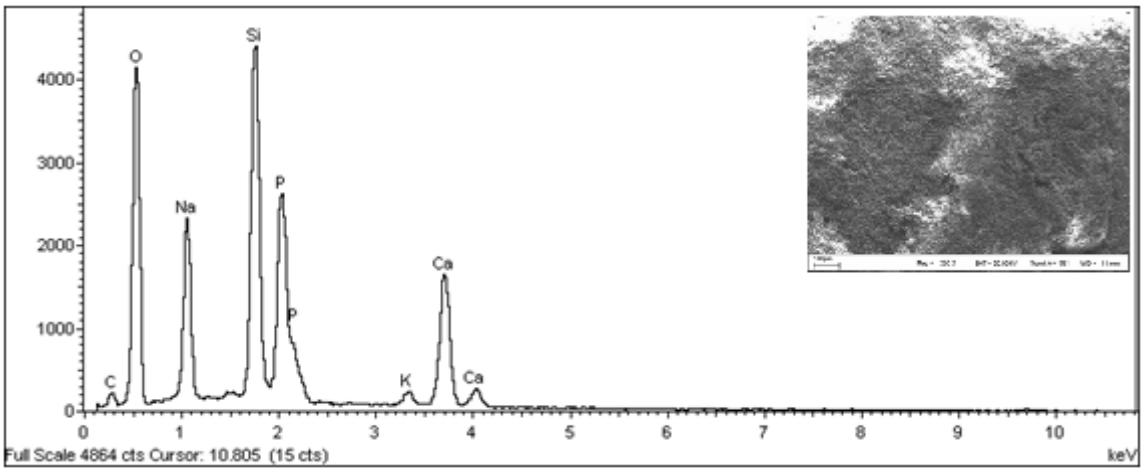
Şekil 4.107. B40G20 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

Biyocam esaslı ve %20 oranında jelatin katkılı (B40G20 kodlu) biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX analiz sonuçları Şekil 4.107'de verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre, B40G20 kodlu biyo-greftin içeriğindeki biyocama (SiO_2, Na_2O, CaO, P_2O_5 içerikli), P_2O_5 ve KH_2PO_4'e bağlı olarak yoğun miktarda Si, Na, O, Ca ve P iyonları görülürken, jelatine ve KH_2PO_4'e bağlı olarak da düşük miktarda C ve K iyonları görülmektedir.



Şekil 4.108. B20G50 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X1000, (c) X2000 ve (d) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü.

Biyocam esaslı ve %50 oranında jelatin katkılı (B20G50 kodlu) alternatif biyo-greftin farklı büyütmelerde alınan SEM görüntüleri Şekil 4.108'de verilmektedir. X250 büyütmede biyocam esaslı jelatin içerikli biyo-greftler de jelatin miktarı arttıkça por miktarının arttığı, fakat makroporların mikroporlara dönüştüğü görülmektedir. Ayrıca B20G50 kodlu biyo-greftte görülen mikroporların farklı yükseltilerde olduğu ve tane sınırları belirli olmadan güçlü bir şekilde bağlandığı Şekil 4.108 (a-d)'de tespit edilmektedir. X2000 ve X5000 büyütmelerde ise biyo-greftin farklı boyutlarda küresel porlardan oluştuğu ve yoğun bir por dağılımına sahip olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.108 (c-d)).



(a)

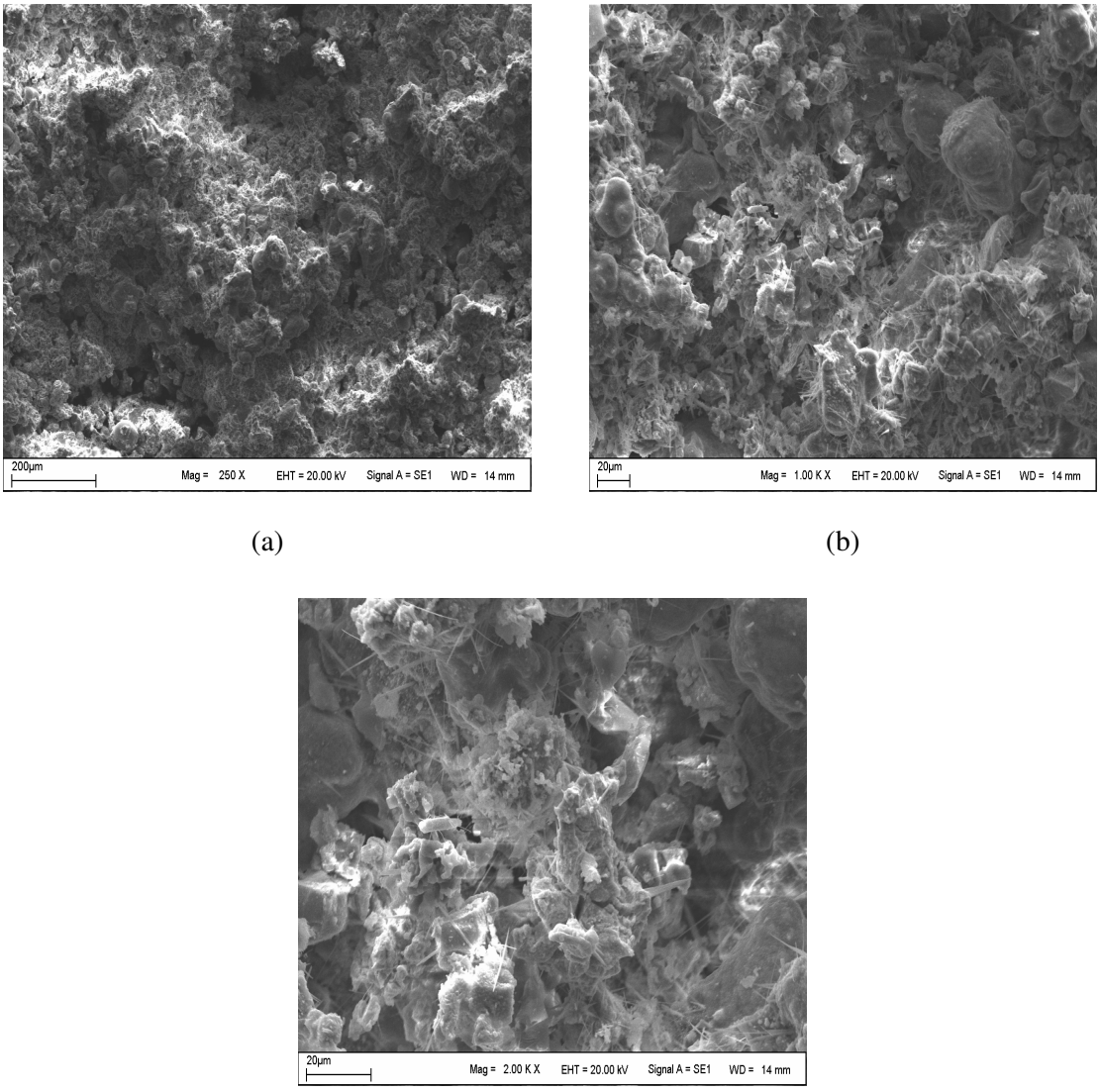
Element	C	O	Na	Si	P	K	Ca
%Ağırlık	3.77	49.07	9.14	14.63	10.49	1.02	11.89
%Atomik Ağırlık	6.32	61.83	8.01	10.50	6.83	0.52	5.98

(b)

Şekil 4.109. B20G50 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

Kıkırdak doku mühendisliğinde, doku üretimi için kullanılan biyomalzemeler genelde polimerik malzemeler olup, doğal ve sentetik olarak iki grupta toplanmaktadır. Kullanılan doğal polimerler kıkırdak doku mühendisliği için biyoaktif malzemelerdir ve bunlara örnek olarak; aljinat, agaroz, fibrin, hiyaluronik asit, kallojen, jelatin, kitosan, kondiritin sülfat ve selüloz verilebilmektedir [229]. Jelatin, diğer jelleştirici karbonhidratlarla karşılaştırıldığında, bazı avantajlar sağlaması nedeniyle halen tercih edilmekte ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [230]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ortalama molekül ağırlığı az olan (<10 kDa) jelatin hidrolizatının güçlü antioksidan özellik gösterdiğini ortaya koymaktadır [231]. Bu nedenle jelatin hidrolizatı, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanım alanı bulabilmektedir [230]. Bu bilgiler doğrultusunda, mekanik özelliği iyileştirecek dokuyla greft arasındaki kimyasal bağı arttıran biyocam ve güçlü antioksidan özelliğe sahip polimer malzemeler kullanılarak alternatif biyo-greftler üretilmiştir. Ayrıca polimer malzemeler yüksek sıcaklıklarda yapıdan gaz halinde uzaklaşarak bulunduğu bölgede gözeneklerin (porların) oluşmasını sağladığı içinde kullanılmaktadır. Bunun için biyocam esaslı ve polimer (jelatin) katkılı malzemeler kullanılarak biyouyumlu, biyoaktif ve poroz yapıda biyo-greftler üretilmiştir.

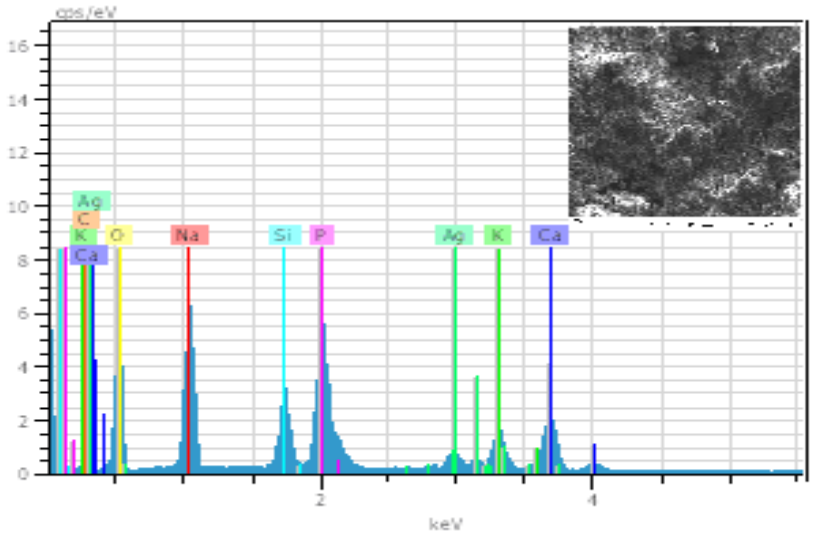
Biyocam esaslı ve %50 oranında jelatin katkılı (B20G50 kodlu) biyo-greftin EDX analiz spektrumu Şekil 4.109'da verilmektedir. Yapılan EDX incelemesi sonucu, B20G50 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünden makroporozların güçlü arabağlantılarla birbirine bağlandığı görülürken, EDX sonucuna göre de C, O, Na, Si, P, K ve Ca elementlerini içerdiği görülmektedir. EDX sonucunda, O, Si, P ve Ca elementlerinin %ağırlık oranlarının yüksek olduğu ve C, Na ve K elementlerinin %ağırlık oranlarınında düşük olduğu Şekil 4.109(a-b)'de gösterilmektedir.



Şekil 4.110. B10G75 kodlu alternatif biyo-greftin (a)X250, (b) X1000 ve (c) X2000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Biyocam esaslı %75 oranında jelatin içerikli (B10G75 kodlu) alternatif biyo-greftin X250-X2000 büyütmeler arasındaki SEM görüntüleri Şekil 4.110 (a-c)'de verilmektedir. X250

büyütmede alınan SEM görüntüsünden, B10G75 kodlu biyo-greftin yükseltiler şeklinde bir yapının yanında makroporlara sahip olduğu da görülmektedir. X1000 büyütmede yüzeyde oluşan makroporların yanında, porları bağlayan arabağlantıların kuvvetli bir bağ oluşturduğu ve yüzeyde tane sınırlarının net olarak görülmediği tespit edilmektedir (Şekil 4.110 (b)). X2000 büyütmede makroporlar daha net görülürken, makroporların yanında oluşan mikroporlarda belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.110(c)).



(a)

Element	C	O	Na	Si	P	K	Ag	Ca
%Ağırlık	1.41	49.09	13.27	3.54	7.35	5.18	10.98	9.18
%Atomik Ağırlık	2.562	69.85	12.58	2.74	5.17	2.89	2.22	4.19

(b)

Şekil 4.111. B10G75 kodlu alternatif biyo-greftin X250 büyütmede alınan EDX spektrumu

Biyocam esaslı ve %75 oranında jelatin katkılı (B10G75 kodlu) biyo-greftin EDX analiz spektrumu Şekil 4.111'de verilmektedir. Yapılan EDX analizi sonucu, B10G75 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünden makroporozların güçlü arabağlantılarla birbirine bağlandığı görülürken, EDX sonucuna göre de C, O, Na, Si, P, K, Ag ve Ca iyonlarını içerdiği görülmektedir. Ayrıca O, Na, Ca ve Ag miktarının yüksek, C, Si, P ve K miktarının ise düşük olduğu gözlenmiştir.

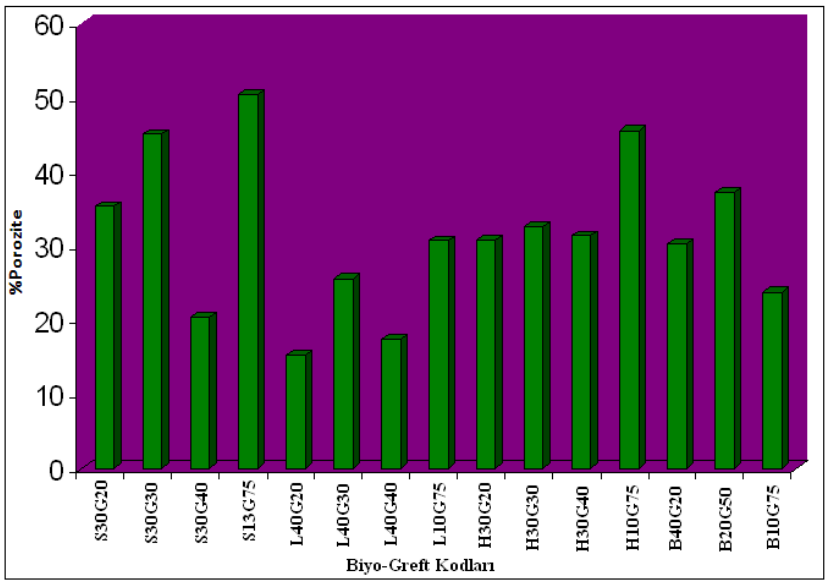
4.3.4.1.Porozite Analizleri

Sübye kemiği, lületaşı, hidroksiapatit ve biyocam esaslı alternatif biyo-greftlere %20, 30, 40 ve 75 ağırlık oranlarında jelatin ilave edilerek poroz yapı elde edilmeye çalışılmıştır. Sol-jel yöntemiyle üretilen biyo-greftler jel haline getirildikten sonra 0,5 mm çapında ve 1 mm yüksekliğinde silindir şeklindeki plastik kalıplara dökülerek şekillendirilmiştir. Daha sonra bir kısım jelatinin ve nemin yapıdan uzaklaşmasını sağlamak amacıyla 500°C'de kül fırınında kurutulmuş ve kontrollü atmosfer fırınında(Ar atmosferinde) 1200°C de 2,5 saat sinterlenmiştir. Daha sonra jelatinin sinterleme sırasında yapıdan uzaklaştırılması sonucu elde edilen poroz miktarını görmek için %porozite ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.112 ve Tablo 7.2.de ölçüm yöntemi Bölüm 4.8.'de anlatılan poroz yapıya sahip biyo-greftlerin % porozite sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.2. Poroz yapıdaki (HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Esaslı) alternatif biyo-greftlerin %porozite sonuçları.

Numune Kodları	S30G20	S30G30	S30G40	S13G75	L40G20	L40G30	L40G40	L10G75
Porozite Değerleri (%)	35,3	45,1	20,4	50,5	15,3	25,6	17,5	30,7

Numune Kodları	H30G20	H30G30	H30G40	H10G75	B40G20	B20G50	B10G75
Porozite Değerleri (%)	30,8	32,6	31,4	45,6	30,3	37,2	23,8



Şekil 4.112. Poroz yapıdaki (HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Esaslı) alternatif biyo-greftlerin %porozite sonuçları.

Sübye kemiği, lületaşı, hidroksiapatit ve biyocam esaslı ve %20, 30, 40 ve 75 oranlarında jelatin katkılı biyo-greftlerin %porozite sonuçları Tablo 4.2 ve Şekil 4.62'de verilmektedir. Sübye kemiği esaslı poroz yapıya sahip biyo-greftler incelendiğinde, %40 jelatin içerikli biyo-greft hariç bütün biyo-greftlerde jelatin miktarı arttıkça porozite miktarının arttığı görülmektedir. SEM-EDX görüntüleriyle % porozite sonuçları kıyaslandığında, jelatin miktarı arttıkça poroz miktarının arttığını göstermektedir (Şekil 4.88-Şekil 4.110). Böylece sıcaklığın etkisiyle yapıdan uzaklaşan jelatin miktarı arttıkça gözeneklerin arttığı tespit edilmiştir. Fakat %30 sübye kemiği esaslı ve %40 jelatin konsantrasyonuna sahip biyo-greftin (S30G40 kodlu) yüzeyinden alınan SEM görüntüsünde, istenilen poroz yapının elde edilmemesinden dolayı, poroz miktarının en düşük değerde olduğu %porozite ölçümlerinde gözlenmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, sübye kemiği esaslı biyo-greftlerin SEM-EDX sonuçları ve %porozite hesapları birbirini desteklediği görülmektedir.

Lületaşı esaslı jelatin içerikli biyo-greftler kıyaslandığında, jelatin miktarı %20'den %30'a yükseldiğinde porozite miktarının arttığı, %40 jelatin konsantrasyonunda porozite miktarının en düşük değerde olduğu ve %75 jelatin içeriğinde ise lületaşı esaslı biyo-greftin en yüksek porozite değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Lületaşı esaslı jelatin konsantrasyonlu biyo-greftler ile sübye kemiği, HA ve biyocam esaslı jelatin konsantrasyonlu biyo-greftler kıyaslandığında, en düşük %porozite sonuçlarının, lületaşı esaslı jelatin konsantrasyonlu biyo-greftlerden elde edildiği gözlenmekte olup, bu sonuçlar SEM görüntüleriyle desteklenmektedir. Hidroksiapatit esaslı jelatin konsantrasyonlu biyo-greftlerde jelatin içeriğiyle istikrarlı bir artış gösterdiği ve jelatin içeriği arttıkça %porozite miktarının arttığı Şekil 4.112'de görülmektedir.

Biyocam esaslı biyo-greftlerde, en yüksek porozite miktarının %20 biyocam esaslı ve %50 jelatin konsantrasyonlu biyo-greftte (B20G50 kodlu), en düşük porozite miktarının ise %10 biyocam esaslı ve %70 jelatin konsantrasyonlu biyo-greftte (B10G75 kodlu) olduğu tespit edilmektedir. SEM görüntüleriyle kıyaslandığında, porozite miktarı SEM görüntüleriyle desteklenmekte olup, B20G50 kodlu biyo-greftte porozite miktarının en yüksek, B10G75 kodlu biyo-greftte ise poroz çaplarının en büyük fakat poroz miktarının ise minumum olduğu görülmektedir(Şekil 4.106- Şekil 4.110).

4.4.Biyomekanik Testler (Basma Testleri)

İskelet sistemi; iç organları koruyan, sağlam bir kinematik link oluşturan ve vücut hareketlerini destekleyen temel yapıdır[56]. Kemik kendini tamir edebilen, iç yapısını ve konfigürasyonunu mekanik ihtiyaçlara göre ayarlayabilen bir dokudur. Uzun süre devam eden aşırı yüklenme kemik yoğunluğunu değiştirir[56]. Burada yoğunluğu etkileyen iki önemli terim mukavemet ve rijitliktir. Bu özellikleri anlamak için kemiğin yüklenme altında gösterdiği değişiklikleri bilmek gerekir. Mekanik özellikler kırık anında farklı tepkiler verirken, kırık bölgesine yerleştirilen greftlerle daha farklı tepkiler verir. Deforme olmuş defekt bölgesine greft

yerleştirildiğinde kemiğin maruz kaldığı mekanik etkilere greftte maruz kalır. Bunun için yaptığımız çalışmalarda, üretilen greftlerin mekanik özellikleri de incelenmiştir.

Biyomalzemelerin basma yükleri altındaki davranışını belirlemek için statik basma deneyi yapılmıştır. Basma deneyi özellikle çok küçük numunelerin kullanılmasına imkan verdiği için kemik greftlerinin biyomekaniğinin test edilmesinde tercih edilmiştir. Bu amaçlar doğrultusunda, insan kemiğinin ana bileşen malzemesi olan HA'in saf haliyle dayanım ve kırılma tokluğu değeri insan kemiğine göre oldukça düşük olduğundan toz metalurjisi/sol-jel prosesiyle HA esaslı kompozit malzemeler üretilerek basma dayanımı ve kırılma tokluğu gibi mekanik özelliklerin yükseltilebileceği düşünülmüştür.

4.4.1. I. Grup Biyo-Greftlerin Basma Testleri

HA tek başına insan kemiğinden daha düşük basma mukavemeti göstermektedir. Bu nedenle biyomedikal uygulamalarda hidroksiapatit düşük dayanıma sahip olduğu için bazı katkı malzemeleriyle birlikte kullanılmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi, kemiğin yüksek basma dayanımı, organik kollajen ve apatit kristallerden oluşan kompozit bir yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır [54].

Yaptığımız çalışmada, HA üretiminin dışında HA esaslı alternatif biyo-greftler üretilerek insan kemiğinin hem kimyasal bileşim ve morfolojisine hemde mekanik özelliklerine yakın greftler üretilmeye çalışılmıştır. Bölüm 4.1-4.2'de verilen FTIR ve XRD sonuçları üretilen biyo-greftlerden kemiğin kimyasal yapısına benzer yapılar elde edildiğini göstermektedir.

Biyomedikal uygulamalarda kullanılacak olan kalsiyum fosfat içerikli kemik greftlerinin vücut sıvıları ile teması durumunda dayanım bakımından iyi performans göstermeleri arzu edilmektedir. Bu çalışmada, sol-jel yöntemiyle üretilen biyo-greftlerin mekanik özellikleri, sertlik ve basma mukavemeti incelenerek değerlendirilmiştir. Ayrıca üretilen biyo-greftlerin basma dayanımı ve uygulanan kuvvete karşı gösterdiği elastik direnç ölçülmüştür. Elastoplastik enerji (Eep), malzemenin birim hacmi başına düşen plastik şekil değiştirme enerjisi olarak tanımlanır ve malzemenin kırılıncaya kadar enerji depolama veya soğurma yeteneğini gösterir. Eep enerjisi, genellikle σ-ε eğrisinin altında kalan alanın ($\int^{\sigma.d\varepsilon}$) hesaplanması ile bulunur. Bu formüldeki σ gerilme değerini verirken, ε malzemede kırılıncaya kadar meydana gelen en yüksek veya toplam birim şekil değiştirme miktarıdır.

Yapılan deneysel çalışmalarda, sol-jel yöntemiyle üretilen biyo-greftler (ASTM E9 standartlarında) genel numune şekli ve kesiti olan düz silindirik numune boyutlarında üretilmiştir. Bunun için 1,5mm çapında ve 4,5mm yüksekliğinde silindirik şekilde biyo-greftler kullanılmıştır.

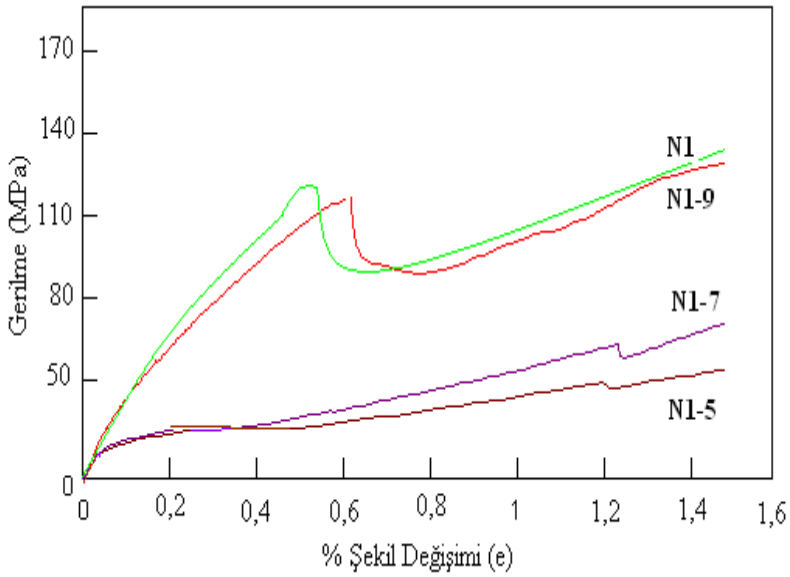
Hazırlanan numuneler Shımadzu marka AG-X 50kN çekme-basma cihazıyla basma testleri uygulanarak maksimum kuvvet, maksimum gerilme ve %Uzama sonuçları incelenmiş ve sonuçları Tablo 4.3-Tablo 4.4'de, Gerilme-%Uzama grafikleri de Şekil 4.113-4.121 arasında verilmiştir. Basma testleri için 2 mm/dak basma hızı kullanılmış ve biyo-greftler tamamen kırılıp deforme oluncaya kadar basma kuvveti uygulanmıştır.

Tablo 4.3. Hidroksiapatit sentez biyo-greftlerinin basma testi sonuçları

Biyo-greft Kodları	Maksimum Gerilme (MPa)	%Şekil Değişimi (e)	Eep (Joule)
N1-12	119	0,51	24,93
N1-5	38	1,23	13,34
N1-7	40	1,27	16,60
N1-9	117	0,61	22,50

Şekil 4.113-Şekil 4.114(a-c) arasındaki grafikler, H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu HA esaslı biyo-greftler ile N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu HA sentez biyo-greftlerinin Gerilme-%Şekil Değişimi(e) grafiklerini vermektedir. Bütün grafiklerden üretilen biyo-greftlerin bir elastik bölge ile birlikte akma bölgesi gösterdiği görülürken, basma mukavemeti en düşük olan sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz N1-12 kodlu HA sentez biyo-greftinde bile 1mm'nin üzerinde yer değişimi gösterdiği görülmektedir. Üretilen HA sentez biyo-greftleri (N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu) ve HA esaslı biyo-greftlerin (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) Tablo 4.3-Tablo 4.4 arasındaki tablolarda verilen maksimum gerilme değerleri incelendiğinde, sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA esaslı biyo-greftlerin(H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) HA sentez biyo-greftlerden (N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu) daha yüksek maksimum gerilme değeri verdiği ve bütün biyo-greftler içinde en yüksek gerilmenin Yttria içerikli biyo-greftte görüldüğü Tablo 4.3 ve Şekil 4.113 ve Şekil 4.114'de tespit edilmektedir.

Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA sentez biyo-greftleri üzerine (N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu) yapılan basma deneyinde en yüksek basma mukavemetini N1-12 kodlu biyo-grefttin verdiği ve pH değeri düştükçe maksimum basma mukavemetininde düştüğü Şekil 4.113'de görülmektedir.



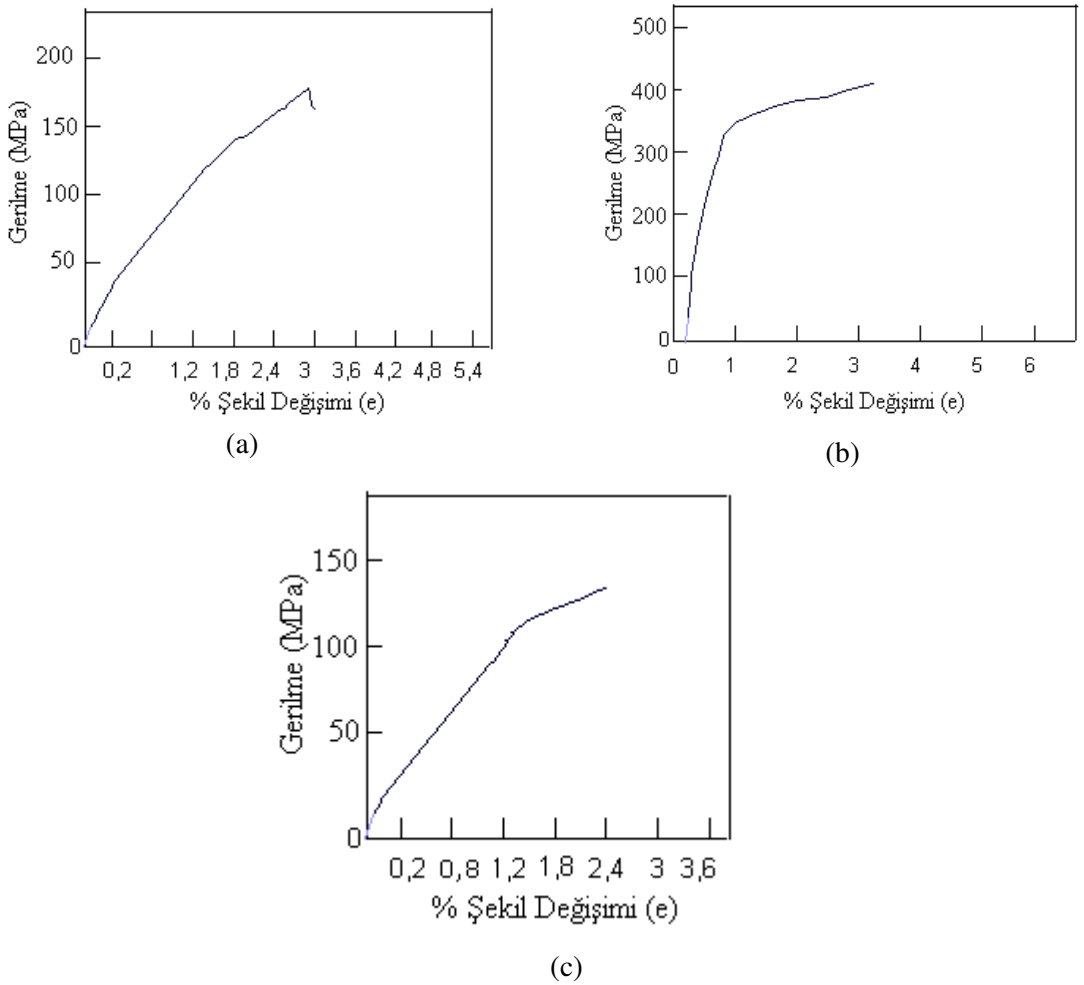
Şekil 4.113. HA sentez biyo-greftlerinin [N1-5 (pH=5), N1-7 (pH=7), N1-9 (pH=9) ve N1-12 (pH=12) kodlu] basma deneyi sonucu Gerilme-%Şekil Değişimi grafiği

Farklı pH değerlerine sahip HA sentez (N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu) biyo-greftlerinin Gerilme-%Şekil Değişimi diyagramı Şekil 4.113'de verilmektedir. pH değeri 12 olan HA sentez (N1-12 kodlu) biyo-greftine nitrik asit ve fosforik asit ilave edilerek pH değerleri 5 (N1-5 kodlu), 7 (N1-7 kodlu) ve 9 (N1-9 kodlu) olan biyo-greftler üretilmiş ve basma testi yapılarak mekanik özellikleri incelenmiştir. pH değerleri farklı olan HA sentez biyo-greftlerinin basma testi sonuçları karşılaştırıldığında, benzer Gerilme-%Şekil Değişimi eğrisi verdiği, fakat en yüksek gerilmeyi pH değeri en yüksek olan (pH=12) N1-12 kodlu biyo-greftten elde edildiği görülürken, pH değeri düştükçe basma gerilmesinin düştüğü de görülmektedir. Fakat %Şekil Değişimi maksimum gerilme değeriyle ters orantılı olup, pH değeri düştükçe ve maksimum basma gerilmesi arttıkça %Şekil Değişimi değerinin düştüğü Şekil 4.113'de görülmektedir. Ayrıca Tablo 4.3'de verilen Eep değerleri Gerilme-%Şekil Değişimi eğrisinin altında kalan alanın elastoplastik enerjisini vermekte olup, darbelere karşı dayanım derecesini verir. Dolayısıyla kırılma tokluğu (Kıc) hesaplanmamış olmasına rağmen, kırılma tokluğuyla doğru orantılı olan elastoplastik enerjiyi hesaplamamız ürettiğimiz biyo-greftlerin kırılma toklukları hakkında genel bir bilgi edinmemizi sağlanmaktadır. HA sentez biyo-greftlerinin Eep sonuçlarına bağlı olarak, en düşük kırılma tokluğunu N1-7 kodlu biyo-greftin ve en yüksek kırılma tokluğunu da N1-12 kodlu biyo-greftin verdiği belirlenmektedir.

4.4.2. II. Grup Biyo-Greftlerin Basma Testleri

Tablo 4.4. Hidroksiapatit esaslı biyo-greftlerin basma testi sonuçları

Biyo-greft Kodları	Maksimum Gerilme (MPa)	%Şekil Değişimi (e)	Eep (Joule)
H60	198	2,47	20,43
H50Y10	332	3,47	26,79
H30Ca	120	2,43	20,15



Şekil 4.114. H60 (a), H50Y10 (b) ve H30Ca (c) kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi Gerilme-%Şekil Değişimi grafikleri

HA'in mekanik özellikleri insan kemiğinden daha düşük olduğu için ve kemiğin kimyasal yapısında HA dışında K, Na, Mg gibi iyonlar olduğundan dolayı, HA'e KH_2PO_4, Na_2CO_3, P_2O_5 ve CaO gibi kimyasal bileşikler ilave edilerek kemiğin basma dayanımına ve kimyasal yapısına benzer

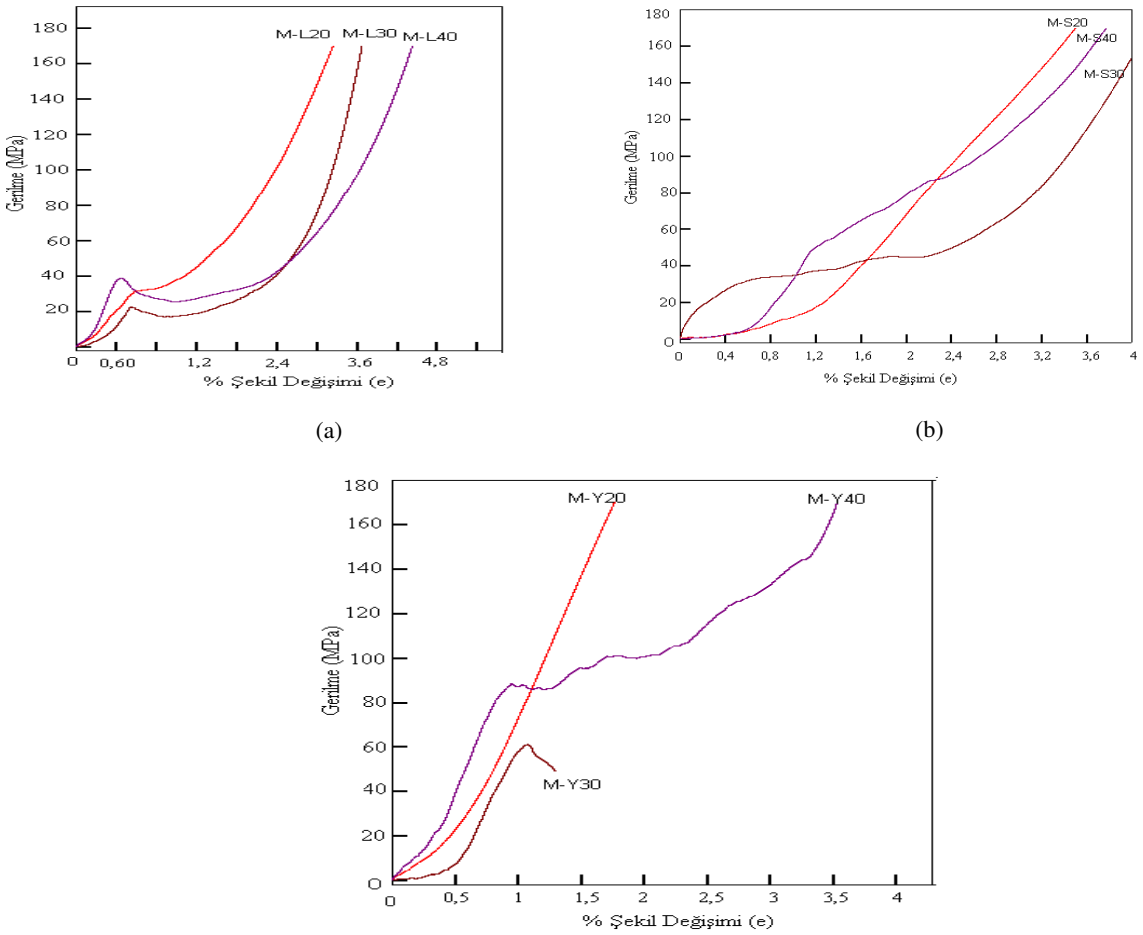
biyo-greftler üretilmeye çalışılmıştır. Bunun için, %60 HA esaslı (H60 kodlu), %30 HA esaslı ve CaO katkılı (H30Ca kodlu) ve %50 HA esaslı ve %10 Yttria katkılı (H50Y10 kodlu) biyo-greftlere basma deneyi uygulanmıştır. Şekil 4.114(a-c)'de H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu biyo-greftlerin Gerilme-%Şekil Değişimi grafiklerini vermekte olup, deformasyon başlangıcında bir elastik deformasyon ve daha sonrasında da bir akma noktasıyla birlikte bir plastik deformasyon bölgesi verdiğini göstermektedir. H60, H50Y10 ve H30Ca kodlu alternatif biyo-greftlerin maksimum basma gerilmesi değerleri kıyaslandığında, H50Y10 kodlu biyo-greftin 332 MPa'lık en yüksek basma gerilmesi değerini ve H30Ca kodlu biyogreftin ise 120 MPa'lık en düşük basma gerilmesi değerini verdiği gözlenmektedir. H60, H50Y10 ve H30Ca kodlu biyo-greftlerin %Şekil Değişimi değerleri kıyaslandığında ise, H50Y10 kodlu biyo-greft 5,17'lik en yüksek % Şekil Değişimi değeriyle ve H30Ca kodlu biyo-greft ise, 2,43'lük en düşük % Şekil Değişimi değerini verdiği Şekil 4.114(a-c)'de belirlenmektedir.

HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerle HA sentez (N1-12, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu) biyo-greftleri kıyaslandığında, HA esaslı biyo-greftlerin(H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) daha yüksek gerilme ve kırılma tokluğu değerlerini verdikleri tespit edilmektedir. HA esaslı biyo-greftler içerisinde ise, en yüksek gerilmeyi H50Y10 kodlu biyo-greft vermekte olup, elastoplastik enerji değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek enerjiyi H50Y10 ve en düşük enerjiyi de H30Ca kodlu biyo-greftin verdiği gözlenmektedir. Enerji değerlerine bağlı olarak en yüksek kırılma tokluğunu H50Y10 ve en düşük kırılma tokluğunu da H30Ca kodlu biyo-greftin verdiği belirlenmektedir.

4.4.3. III. Grup (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) Biyo-Greftlerin Basma Testleri

Tablo 4.5. HA esaslı sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu içerikli greftlerin basma deneyi sonucu maksimum gerilme ve maksimum kuvvet değerleri.

Biyo-greft Kodları	**Maksimum Kuvvet (N)**	**Maksimum Gerilme (MPa)**	**%Şekil Değişimi (e)**	**Eep (Joule)**
N-H30S40	3,00	169	2,2	20,48
N-H30S30	3,00	170	5,1	23,94
N-H30S20	3,00	169	3,2	15,42
M-H30S40	3,00	169	3,7	24,07
M-H30S30	3,00	170	4,1	22,25
M-H30S20	3,00	170	3,5	11,52
N-H30L40	3,00	170	4,0	18,15
N-H30L30	3,00	170	4,5	37,49
N-H30L20	3,00	159	2,6	21,71
M-H30L40	3,00	170	4,0	23,95
M-H30L30	3,00	170	3,2	23,93
M-H30L20	3,00	169	2,8	21,33
N-H30Y40	3,00	169	3,5	46,75
N-H30Y30	1,22	60,7	3.3	11,95
N-H30Y20	3,00	151	3,8	25,52
M-H30Y40	3,00	190	3,5	46,57
M-H30Y30	3,00	120	1,5	14,20
M-H30Y20	3,00	80	1,7	16,42



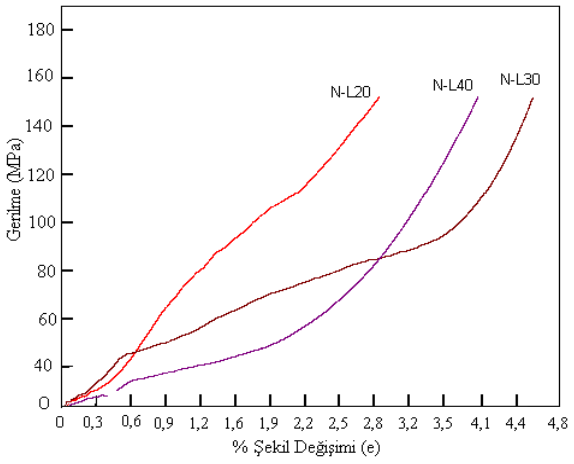
Şekil 4.115. Mikron boyutta HA esaslı alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrileri (a) M-H30L20, M-H30L30, M-H30L40 kodlu biyo-greftler, (b) M-H30S20, M-H30S30, M-H30S40 kodlu biyo-greftler, (c) M-H30Y20, M-H30Y30, M-H30Y40 kodlu biyo-greftler.

Mikron boyutta HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı (M-H30S20, M-H30S30, M-H30S40 M-H30L20, M-H30L30, M-H30L40, M-H30Y20, M-H30Y30, M-H30Y40 kodlu) alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonucu Gerilme-%Şekil Değişimi grafiği Şekil 4.115 (a-c)'de verilmektedir. Bütün Gerilme-% Şekil Değişimi grafiklerinde biyo-greftlerin elastik bölge, akma noktası ve maksimum gerilme verdiği görülmektedir.

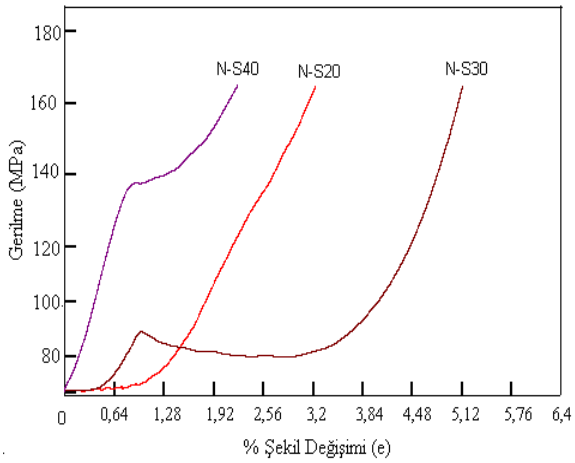
Farklı oranlarda lületaşı, yumurta kabuğu ve sübye kemiği içerikli biyo-greftlerin basma deneylerinde, genel olarak bütün biyo-greftlerin birbirine yakın gerilme değerleri verdiği görülmektedir. Buna rağmen, en yüksek basma gerilmesi değerini M-H30Y40 kodlu biyo-greftin (190MPa) verdiği görülürken, en düşük basma gerilmesini de N-H30Y30 kodlu biyo-greftin (60,7MPa) verdiği gözlenmektedir. Lületaşı ve sübye kemiği katkılı biyo-greftlerin %Şekil Değişimi kıyaslandığında, lületaşı miktarıyla doğru orantılı olarak lületaşı miktarı arttıkça % Şekil Değişiminin arttığı gözlenirken, sübye kemiği içerikli biyo-greftlerden en yüksek % Şekil Değişimi

%30 HA esaslı ve %30 sübye kemiği katkılı (M-H30S30 kodlu) biyo-greftten elde edildiği gözlenmiştir. Mikron boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftlerde diğer biyo-greftlerden farklı bir yapının oluştuğu, böylece %30 HA esaslı ve %20 yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y20 kodlu) biyo-greftte net bir elastik bölge, akma noktası görülmezken, %30 HA esaslı ve %30-40 yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y30, M-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerde bu bölgeler net olarak görülmektedir. Ayrıca en yüksek gerilme ve % Şekil Değişimi değerini %30 HA esaslı ve %40 yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y40 kodlu) biyo-greftten ve en düşük gerilme ve % Şekil Değişimini de %30 HA esaslı ve %20 yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y20 kodlu) biyo-greftte elde edildiği Şekil 4.115(c)'de gözlenmektedir. Bütün basma deneyi sonuçları Bölüm 4.3'deki SEM görüntüleriyle kıyaslandığında, lületaşı içerikli biyo-greftlerde en iyi görüntünün %30 HA esaslı ve %30 lületaşı katkılı (M-H30L30 kodlu) biyo-greftten elde edildiği, yani yapının kompakt olduğu, sıvı faz sinterlemesinin görüldüğü ve porların olmadığı görülürken, %30 HA esaslı ve %40 lületaşı katkılı ((M-H30L40 kodlu) biyo-greftte sınırlarda porların oluştuğu ve bu porların bazı tane sınırı bölgelerinde ayrılmalara neden olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak da en yüksek gerilme değerinin %30 lületaşı katkılı (M-H30L30 kodlu), en düşük gerilme değerinin de %30 HA esaslı ve %40 lületaşı katkılı ((M-H30L40 kodlu) biyo-greftten elde edildiği tespit edilmektedir.

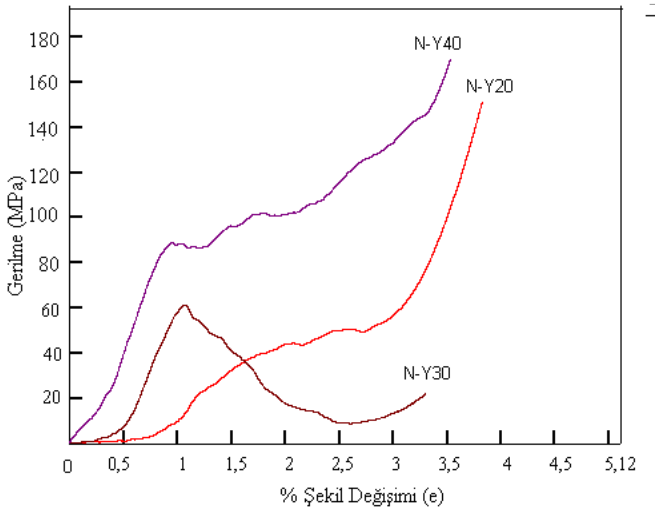
Sübye kemiği içerikli biyo-greftlerde basma deneyi sonuçları SEM görüntüleriyle desteklenmektedir. Buna bağlı olarak, en yüksek basma mukavemetinin %30 HA esaslı ve %30 sübye kemiği katkılı ((M-H30S30 kodlu) biyo-greftten elde edilmesi, M-H30S30 kodlu biyo-greftin SEM görüntülerinde kompakt, tane sınırları belirgin ve porların olmadığı bir morfolojik yapıya sahip olması sonucuyla desteklenmektedir. Benzer kıyaslama yumurta kabuğu içerikli alternatif biyo-greftlerde de görülmektedir. %30 HA esaslı ve %20 yumurta kabuğu katkılı ((M-H30Y20 kodlu) biyo-greftlerin SEM görüntülerinde kompakt, fakat keskin köşelere sahip tanelerin olması M-H30Y20 kodlu biyo-greftin basma mukavemetinin en düşük değerde olmasının nedenini açıklamaktadır. %30 HA esaslı ve %40 yumurta kabuğu katkılı ((M-H30Y40 kodlu) biyo-greftin SEM görüntüsünde ise, porların olmasına rağmen sıvı faz sinterlemesine bağlı olarak enerjinin en fazla toplandığı ve çatlakların oluşmasını kolaylaştıran keskin köşelerin olmasını engellediği için en yüksek basma mukavemetinin M-H30Y40 kodlu biyo-greftten elde edildiği gözlenmektedir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.116. Nano boyutta HA esaslı alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrileri (a) N-H30L20, N-H30L30, N-H30L40 kodlu biyo-greftler, (b) N-H30S20, N-H30S30, N-H30S40 kodlu biyo-greftler, (c) N-H30Y20, N-H30Y30, N-H30Y40 kodlu biyo-greftler.

Nano boyutta HA ve mikron boyutta sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu içerikli biyo-greftlerin basma deneyi sonuçları Şekil 4.116 (a-c)'de verilmektedir. Şekil 4.116 (a)'da nano boyutta HA esaslı ve %20, %30 ve %40 oranlarında lületaşı katkılı (N-H30L20, N-H30L30, N-H30L40 kodlu) biyo-greftlerin Gerilme-%Şekil Değişimi grafiğini vermektedir. N-H30L20, N-H30L30, N-H30L40 kodlu biyo-greftlerden en yüksek gerilme değerini N-H30L30 kodlu biyo-greftin, en düşük gerilme değerini de N-H30L40 kodlu biyo-greftin verdiği görülmektedir. N-

H30L20, N-H30L30, N-H30L40 kodlu biyo-greftlerin basma gerilmesi sonuçlarıyla Bölüm 4.3 deki SEM görüntüleri kıyaslandığında, sonuçların birbirini desteklediği gözlenmektedir. Böylece N-H30L30 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünden en iyi görüntünün elde edildiği görülürken, buna bağlı olarak N-H30L30 kodlu biyo-greftin düşük oranda por yapısına sahip olduğu ve sıvı faz sinterlemesine bağlı olarak görülen kompakt yapısına bağlı olarak en yüksek basma mukavemetine sahip olduğu görülmektedir. N-H30L40 kodlu biyo-greftin SEM görüntüsünde görülen büyük ve yoğun por yapısına bağlı olarak da basma mukavemetinin en düşük olduğu tespit edilmektedir.

Nano boyutta HA esaslı ve sübye kemiği katkılı biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi grafiği Şekil 4.116 (b) verilmektedir. Yapılan inceleme sonucu, en yüksek gerilme değerini N-H30S40 kodlu biyo-grefttin verdiği gözlenirken, en düşük gerilme değerini de N-H30S20 kodlu biyo-grefttin verdiği gözlenmektedir. Bölüm 4.3'de verilen SEM görüntüleriyle karşılaştırıldığında, N-H30S40 kodlu biyo-greftin sıvı faz sinterlemesine bağlı olarak kompakt görüntüsüne karşı, N-H30S20 kodlu biyo-greftte tane sınırlarının daha belirgin ve tanelerin birleşmesinin N-H30S40 kodlu biyo-grefte göre daha az olduğu görülmektedir.

Şekil 4.116 (c) nano boyutta %30 oranında HA esaslı ve %20, %30 ve %40 oranlarında yumurta kabuğu katkılı (N-H30Y20, N-H30Y30, N-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerin Gerilme-%Şekil Değişimi grafiğini vermektedir. Yumurta kabuğu içerikli biyo-greftlerin Bölüm 4.3'de verilen SEM görüntülerinde, N-H30Y20 kodlu biyo-greftin kompakt fakat büyük porlara sahip bir yapısı olduğu için en düşük basma mukavemetini verdiği ve N-H30Y40 kodlu biyo-greftin SEM görüntülerinde ise, tanelerin daha küçük ve porların daha az olmasına bağlı olarak en yüksek basma gerilmesini verdiği Tablo 4.4 ve Şekil 4.116 (c)'de görülmektedir.

Nano ve mikron boyutta HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı bütün biyo-greftlerin kırılma mukavemetiyle doğru orantılı olan elastoplastik enerji değerleri kıyaslandığnda, mikron boyutta HA esaslı ve %40 yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y40 kodlu) biyo-greftin en yüksek kırılma mukavemeti değerini verdiği gözlenirken, en düşük kırılma mukavemeti değerini de mikron boyutta HA esaslı ve %20 oranında sübye kemiği katkılı (M-H30S20 kodlu)biyo-greftin verdiği belirlenmektedir.

4.4.4. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Tozu Esaslı) Biyo-Greftlerin Basma Testleri

Yeni bir biyomalzeme sentezlerken göz önüne alınması gereken ilk şey malzemenin biyolojik, tıbbî ve mühendislik özelliklerini uygun bir şekilde birbirleri ile bütünleştirilebilmektir. Biyomalzemenin hazırlanma işlemi biyolojik ve yapısal özellikler açısından kompleks bir

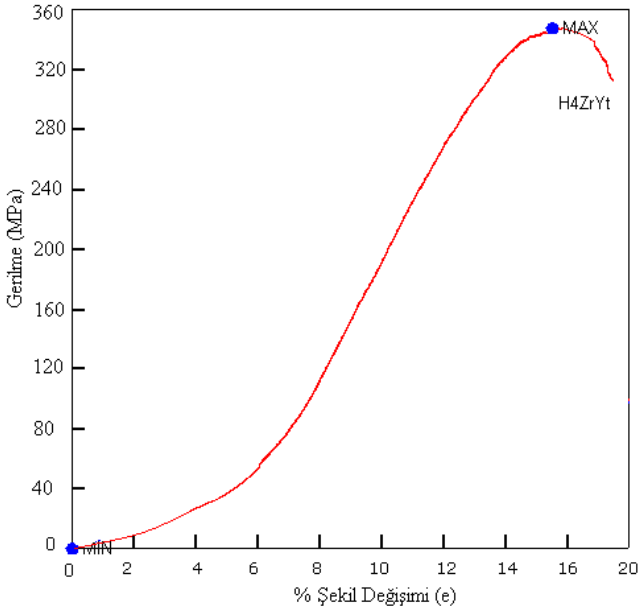
durumdur. Malzeme Bilimi ve Mühendislik dallarına düşen görev, hazırlanan malzemenin arzu edilen mekanik özelliklerini örneğin; bozunma hızı, şekillendirilme özelliği, yüzey morfolojisi ve porozitesi vb. gibi kullanılacak dokunun özelliklerine göre uyarlayabilmektir [258].

Tablo 4.6. Poroz yapıya sahip HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftlerin basma deneyi sonucu maksimum gerilme, maksimum kuvvet, %şekil değişimi ve elastoplastik enerji değerleri.

Numune Kodu	Maksimum Kuvvet (N)	Maksimum Gerilme (MPa)	%Şekil Değişimi (e)	Eep (Joule)
H40ZrYt	3,34	347	15,5	40,53
H30G20	3,34	140	1,55	16,79
H30G30	3,34	170	1,50	15,50
H30G40	3,34	157	1,53	16,54
H10G75	3,34	42	1,21	13,20
S30G20	3,03	91	1,61	17,16
S30G30	1,02	263	0,53	11,23
S30G40	3,34	295	1,94	23,45
S13G75	6,35	165	0,20	8,06
L40G20	3,38	91	1,61	18,13
L40G30	3,38	78	1,61	18,69
L40G40	1,02	400	0,53	17,98
L10G75	6,35	288	0,20	42,41
B40G20	5,07	177	1,02	33,45
B20G50	5,07	160	0,96	31,06
B10G75	5,07	130	0,96	29,51

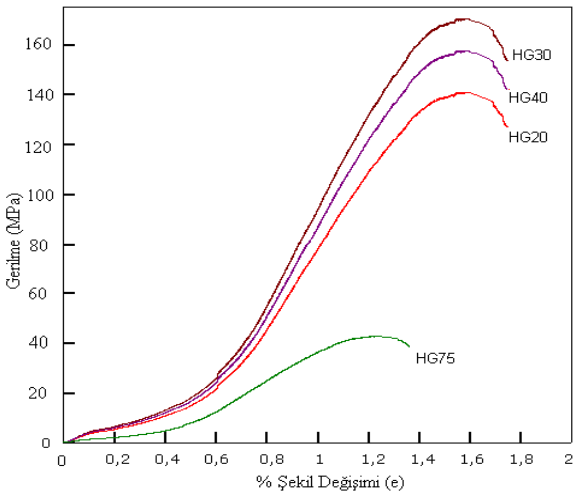
Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftlere poroz yapıyı kazandırmak amacıyla, polimer (jelatin) ilave edilmiştir. Böylece biyo-grefte ilave edilen polimer (jelatin) kurutma ve sinterleme işlemi sırasında yapıdan uzaklaştırılarak bulunduğu bölgede boşluk bırakarak poroz yapı elde edilmiştir.

Tablo 4.6 HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftlere %20, 30, 40 ve 75 oranlarında jelatin ilave edilerek oluşturulan (H30G20, H30G30, H30G40, H10G75, S30G20, S30G30, S30G40, S13G75, L40G20, L40G30, L40G40, L10G75, B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu) biyo-greftlerin basma deneyi sonrası maksimum kuvvet, maksimum gerilme ve %Şekil Değişimi değerlerini vermektedir. Tablo 4.6'da verilen poroz yapıya sahip biyo-greftlerle (IV.grup) yapılan basma deneyi sonuçları biyo-greftlerin mukavemet değerleriyle deformasyon kabiliyeti arasında ters bir orantı olduğunu göstermektedir. Böylece biyo-greftin basma dayanımındaki artış %Şekil Değişimi değerinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.117. H40ZrYt kodlu alternatif biyo-greftin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrisi

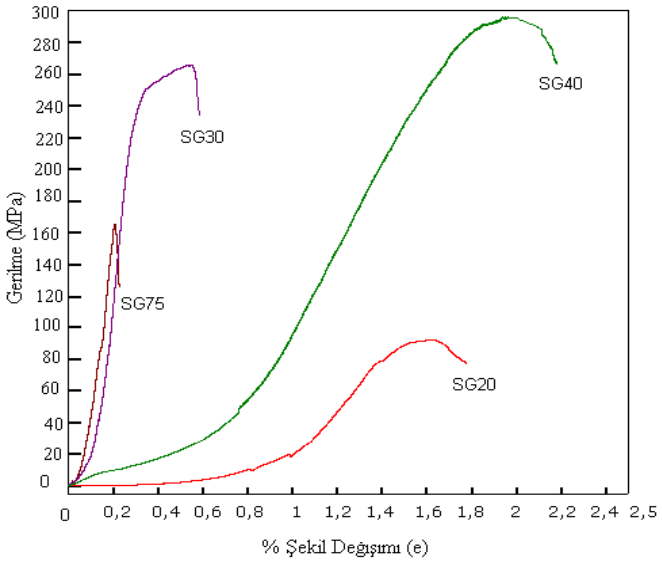
Poroz yapıya sahip biyo-greftlerin mekanik özelliklerini kompakt yapıya sahip biyo-greftlerin mekanik özellikleriyle kıyaslamak amacıyla, %40HA esaslı ve %10 Zr ile %10Yttria içerikli (H40ZrYt kodlu) biyo-greft üretilmiştir. Şekil 4.117, H40ZrYt kodlu biyo-greftin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi diyağramını vermektedir. Gerilme-%Şekil Değişimi diyağramından, H40ZrYt kodlu biyo-greftin sünek bir malzeme olduğu görülürken, 347 MPa'lık maksimum gerilme değerine sahip olduğu da belirlenmiştir.



Şekil 4.118. H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrileri.

Poroz yapıya sahip %10-30 oranları arasında HA esaslı ve %20-75 jelatin katkılı (H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75 kodlu) biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrilesini Şekil 4.118 vermektedir. Basma deneyi sonucu, H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75 kodlu biyo-greftlerin benzer Gerilme-% Şekil Değişimi eğrilerini verdiği gözlenmektedir. H30G20, H30G30 ve H30G40 kodlu biyo-greftlerde ~20 MPa'lık gerilme değerinde bir deformasyon başlangıcının oluştuğu, 140, 170 ve 157 MPa'lık maksimum gerilme değerleri verdiği ve ~120-160 MPa'lık gerilme değerleri arasında tamamen kırıldığı gözlenmiştir. H10G75 kodlu biyo-greftte böyle bir deformasyon başlangıcının olmadığı ve 42 MPa'lık maksimum gerilme değeri verdiği belirlenmiştir. En düşük Gerilme-% Şekil Değişimi değerini %10HA esaslı ve %75 jelatin içerikli (H10G75 kodlu) biyo-greftin verdiği tespit edilmiştir. En yüksek gerilme değerini de 170 MPa gerilme değeri ile %30HA esaslı ve %30 jelatin içerikli (H30G30 kodlu) biyo-greftin verdiği görülürken, daha sonra sırayla 157 ve 140 MPa gerilme değerleri ile %30HA esaslı ve %40-20 jelatin içerikli (H30G40 ve H30G20 kodlu) biyo-greftlerin verdiği görülmüştür.

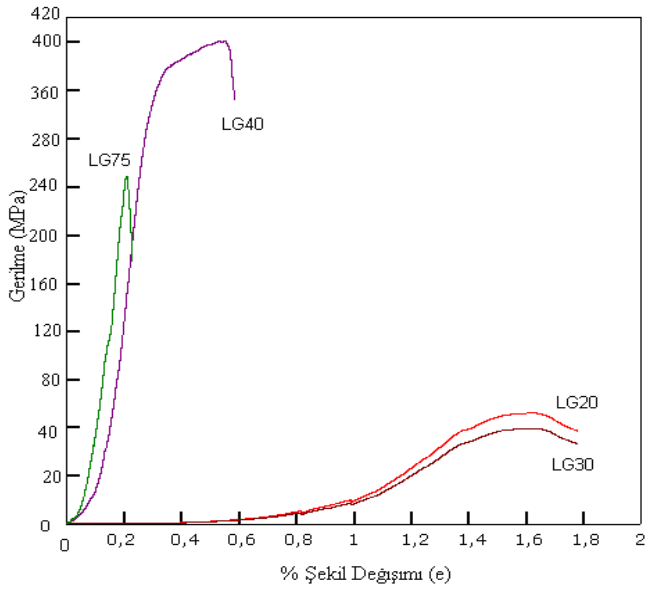
HA esaslı jelatin içerikli (H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75 kodlu) biyo-greftlerin basma deneyi sonuçları Bölüm 4.3.4 de verilen SEM görüntüleriyle desteklenmektedir. Böylece yüksek miktarda poroz yapıya sahip H10G75 kodlu biyo-greftin en düşük Gerilme-% Şekil Değişimi değerini, H30G30 kodlu biyo-greftin de düşük miktarda görülen poroz yapısıyla en yüksek Gerilme-% Şekil Değişimi değerini verdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.119. S30G20, S30G30, S30G40 ve S13G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-% Şekil Değişimi eğrileri

$CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içerikli kimyasal yapıya sahip sübye kemiğine poroz yapıyı kazandırmak amacıyla polimer (jelatin) ilave edilmiştir. Bu nedenle %30 sübye kemiği esaslı ve %20, 30, 40 ve 75 oranların da jelatin katkılı (S30G20, S30G30, S30G40 ve S13G75 kodlu) alternatif biyo-greftler sol-jel yöntemiyle üretilmiştir.

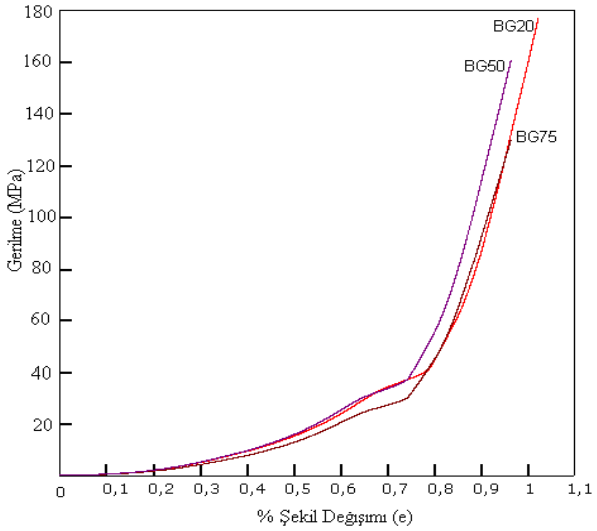
S30G20, S30G30, S30G40 ve S13G75 kodlu biyo-greftlerin basma deneyi sonucu elde edilen Gerilme-% Şekil Değişimi diyağramı Şekil 4.119'da verilmektedir. Benzer eğriler veren S30G20, S30G30, S30G40 kodlu biyo-greftlerin sünek bir davranış sergilediği gözlenmektedir. Ayrıca S30G20 ve S30G40 kodlu biyo-greftlerin ~10-40 MPa gerilme değerlerinde görülen küçük piklerin bu değerlerde bu greftlerin küçük çatlaklar oluşturduğunu göstermektedir. Fakat S13G75 kodlu biyo-greftin bütün biyo-greftlerden farklı bir Gerilme-% Şekil Değişimi eğrisi verdiği gözlenmektedir. Böylece S13G75 kodlu biyo-greftin gevrek bir malzeme olduğu ve 165 MPa gerilme değerine kadar çatlak oluşturmadığı ve bu gerilme değerinden sonra kırıldığı gözlenmektedir. Ayrıca en yüksek basma gerilmesini 295 MPa gerilme değeriyle S30G40 kodlu biyo-greftin verdiği belirlenmektedir. Daha sonra sırayla S30G30 ve S13G75 kodlu biyo-greftlerin 263 ve 165 MPa maksimum gerilme değerleri verdiği tespit edilmiştir. En düşük maksimum gerilme değerini 91 MPa değeri ile S30G20 kodlu biyo-greftin verdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.120. L40G20, L40G30, L40G40 ve L10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrileri

Lületaşı esaslı ve %20, 30, 40 ve 75 jelatin katkılı (L40G20, L40G30, L40G40 ve L10G75 kodlu) alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-%Şekil Değişimi eğrileri Şekil 4.120'de verilmektedir. Yapılan basma deneyinde L40G20, L40G30 ve L40G40 kodlu biyo-greftlerin benzer eğriler verdiği gözlenirken, 400 ve 288 MPa değerleriyle en yüksek gerilme değerlerini L40G40 ve L10G75 kodlu biyo-greftlerin verdiği gözlenmektedir. L40G20 ve L40G30

kodlu biyo-greftlerin 91 ve 78 N/mm^2'lik maksimum gerilme değerleri verdiği tespit edilmiştir. L10G75 kodlu biyo-greftin ise 288 MPa'lık maksimum gerilme değerinde kırılmasıyla gevrek bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca greftlerin basma gerilmeleri değerleri ile % Şekil Değişimi değerlerinin ters orantılı olduğu ve basma dayanımındaki artışın % Şekil Değişimi değerinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir. Böylece gevrek bir yapıya sahip olduğu için L10G75 kodlu biyo-greftin 0,20'lik % Şekil Değişimi değeri verdiği belirlenmiştir. Ayrıca benzer Gerilme-% Şekil Değişimi eğrisi veren L40G20, L40G30 ve L40G40 kodlu biyo-greftlerden en yüksek maksimum gerilme değerine sahip L40G40 kodlu biyo-greftin en düşük (0,53) % Şekil Değişimi değerini ve L40G20 ve L40G30 kodlu biyo-greftlerin ise en yüksek (1,61) % Şekil Değişimi değerlerini verdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.121. B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu alternatif biyo-greftlerin basma deneyi sonrası Gerilme-% Şekil Değişimi eğrileri

Biyocam esaslı ve %20, 50 ve 75 oranlarında jelatin katkılı (B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu) alternatif biyo-greftlerin Gerilme-% Şekil Değişimi diyağramlarını Şekil 4.121 vermektedir. Yapılan inceleme sonucu, B40G20, B20G50 ve B10G75 kodlu biyo-greftlerin benzer grafikler verdiği gözlenmektedir. Ayrıca jelatin miktarıyla ters orantılı olarak jelatin miktarı (poroz yapı) arttıkça maksimum gerilme değerinin düştüğü ve en yüksek maksimum gerilmeyi B40G20 kodlu biyo-greftin (177 MPa değeriyle) ve en düşük gerilmeyi de B10G75 kodlu biyo-greftin (130 MPa değeriyle) verdiği tespit edilmiştir.

Poroz yapıya sahip bütün biyo-greftlerin kırılma mukavemetiyle doğru orantılı olan elastoplastik enerji değerleri kıyaslandığında, en yüksek kırılma mukavemeti değerini L10G75 kodlu biyo-greftin verdiği gözlenirken, en düşük kırılma mukavemeti değerini de S13G75 kodlu biyo-greftin verdiği belirlenmektedir.

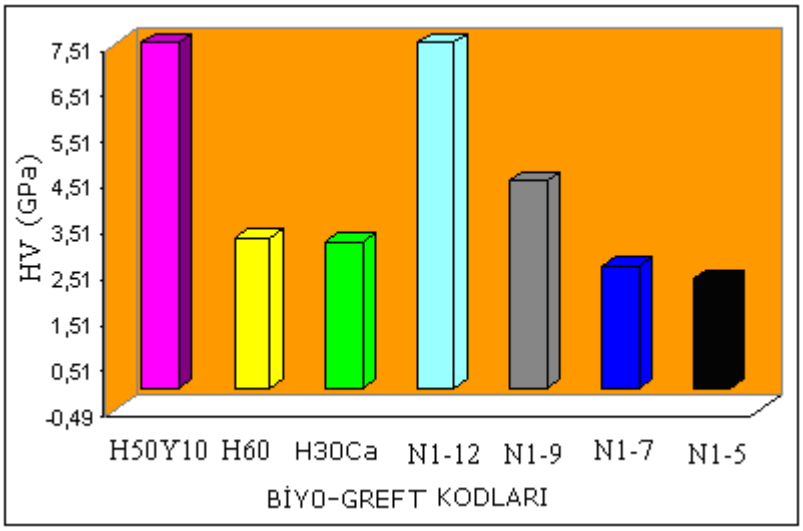
4.5.Sertlik Deneyleri

Ortopedik malzemeler, insan vücudunun çok değişken koşullara sahip olan ortamlarında kullanılmaktadır. Günlük aktiviteler sırasında kemikler değişik gerilmelere maruz kalmaktadır. Aynı şekilde, hareket esnasında ortopedik malzemeler de milyonlarca yükleme çevrimine maruz kalmalarından dolayı mekanik dayanımları ve yorulma dayanımları da önem taşımaktadır [234]. Ortopedik malzemelerin veya kemik onarımında kullanılan greftlerin, üstün mekanik özelliklere ve biyouyumluluğa sahip olmaları gerektiğinden, kullanım yerlerine göre uygun özellikleri taşıması açısından seçimleri büyük önem arz etmektedir. Biyomalzemeler, insan vücudunun değişik bölgelerinde değişik kuvvet ve etkilere maruz kalmaktadır. Örneğin, günlük aktiviteler sırasında kemiklere 4 MPa, tendonlara ise 40–80MPa değerinde gerilmeler etki etmektedir. Bir kalça eklemindeki ortalama yük, vücut ağırlığının 3 katına kadar çıkabilir, sıçrama gibi faaliyetler sırasında bu değer vücut ağırlığının 10 katına kadar çıkabilir. Vücuttaki bu gerilmeler; ayakta durma, koşma, oturma gibi faaliyetler sırasında gün boyunca tekrarlanır. Bu tekrarlı hareketler biyomalzemelerin yorulmasına, çatlamasına ya da plastik deformasyonuna neden olabilmektedir [235]. Bu nedenle kemik onarımı için biyomalzeme üretirken bu özelliklere dikkat etmek gerekir. Biyomalzeme olarak en çok kullanılan bileşiklerden biri olan hidroksiapatit (HA), kemik dokusunun inorganik yapısına sahip olup, kalsiyum fosfat esaslı bir biyoseramiktir. Yapay kemik olarak çeşitli protezlerin yapımında, çatlak ve kırık kemiklerin onarımında ve metalik biyomalzemelerin kaplanmasında kullanılmaktadır [236].

4.5.1. I ve II. Grup Biyo-Greftlerin Sertlik Testleri

Tablo 4.7. I ve II. gruptaki biyo-greftlerin Vickers mikrosertlik değerleri

Biyo-Greft Kodları	**HV (GPa)**
H50Y10	7,51
H30Ca	3,18
H60	3,27
N1	7,51
N1-9	4,52
N1-7	2,65
N1-5	2,39



Şekil 4.122. H60, H30Ca, H50Y10, N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu biyo-greftlerin mikrosertlik grafigi.

Tablo 4.7 ve Şekil 4.122 ürettiğimiz H60, H30Ca, H50Y10, N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu biyo-greftlerin Vickers mikrosertlik değerleri verilmiştir. Yapılan inceleme sonucu bütün biyo-greftlerin sertlik değerlerinin 0,5-7,5 GPa arasında sertlik değerleri verdiği gözlenmiştir.Ayrıca HA esaslı biyo-greftlerin (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) HA sentez (N1-12, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu) biyo-greftlerden daha yüksek sertlik değerini verdiği belirlenirken, en yüksek sertlik değerini yttria içerikli H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftin verdiği görülmektedir. HA sentez biyo-greftlerin de ise, en yüksek sertlik değerinin pH değeri 12 olan HA sentez (N1 kodlu) biyo-greftinden elde edildiği ve pH değeri değiştirilen greftlerin pH değeri düştükçe sertliğinin de düştüğü tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, HA'in sertliğinin 3,34 GPa olduğu belirtilmiş ve ürettiğimiz greftlerle karşılaştırılmıştır[237]. Karşılaştırma sonucu biyo-greftlerle, N1-12 ve N1-9 kodlu biyo-greftlerin ticari HA'den daha yüksek sertlik değeri verdiği görülürken, N1-7, N1-5 kodlu biyo-greftlerin daha düşük sertlik değeri verdiği görülmektedir. Bu sonuçlar, SEM görüntüleri ve basma deneyi sonuçlarıyla kıyaslandığında, birbirini desteklediği görülmektedir. SEM görüntülerinde, sıvı faz sinterlemesine bağlı olarak H50Y10 kodlu biyo-greftin en iyi görüntüyü verdiği ve en yüksek basma mukavemetine sahip biyo-greft olduğu Bölüm 4.3.1 ve 4.4.1'de görülmektedir. H60 ve H30Ca kodlu biyo-greftlerin SEM görüntüsünde tanelerin kompakt bir yapıda olduğu, fakat taneler arasında porların bulunduğu görülmektedir. Bu nedenle H60 ve H30Ca kodlu biyo-greftlerin sertlik ve basma gerilmeleri değeri H50Y10 kodlu biyo-greftten düşüktür. HA sentez biyo-greftlerinin SEM görüntülerinden taneler arası bağlantılarının HA esaslı biyo-greftlerden daha düşük olduğu ve buna bağlı olarak HA sentez biyo-greftlerinin HA esaslı biyo-greftlerden daha düşük sertlik ve basma değeri verdiği Bölüm 4.3.2- Bölüm 4.4.2'de tespit edilmiştir. HA sentez biyo-greftleri arasında yapılan karşılaştırmada, taneler arası bağın en

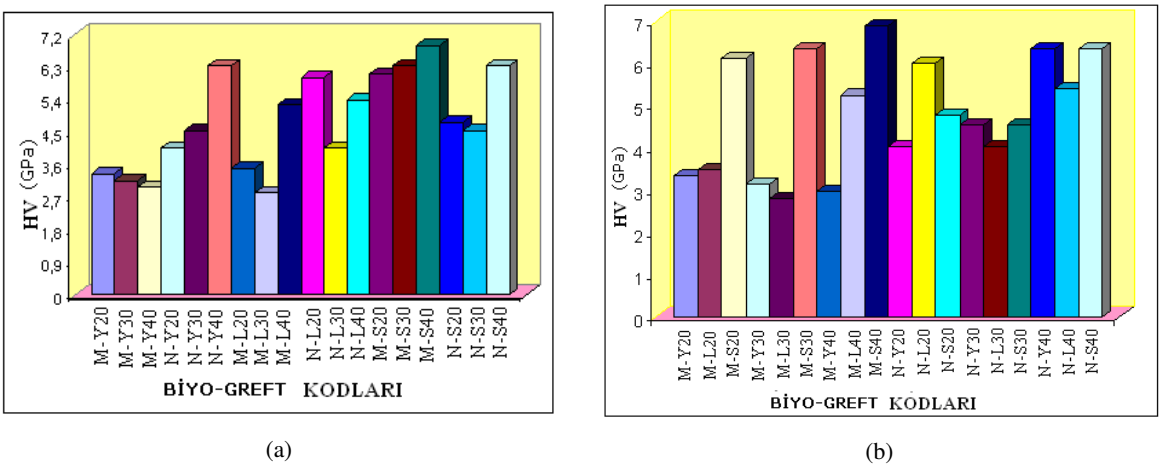
kuvvetli olduğu greftin N1-12 kodlu biyo-greft olduğu ve N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu biyo-greftlerin poroz yapıya sahip olduğu ve pH değeri arttıkça poroz yapının azaldığı ve taneler arası bağın zayıfladığı SEM görüntülerinde görülmektedir. Bu nedenlerden dolayı, en yüksek sertlik ve basma değeri sonucunun N1-12 kodlu biyo-greftten elde edilmesi sonucu SEM görüntüleriyle desteklenmiştir.

4.5.2. III. Grup (Sübye Kemiği, Lületaşı ve Yumurta Kabuğu Katkılı) Biyo-Greftlerin Sertlik Testleri

Tablo 4.8 ve Şekil 4.123'de mikron ve nano boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu, lületaşı ve sübye kemiği katkılı alternatif biyo-greftlerin Vickers mikrosertlik sonuçları verilmektedir. Şekil 4.123(a)'da mikron ve nano boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu, lületaşı ve sübye kemiği içerikli (M-H30S20, M-H30S30, M-H30S40, M-H30L20, M-H30L30, M-H30L40, M-H30Y20, M-H30Y30, M-H30Y40 ve N-H30S20, N-H30S30, N-H30S40, N-H30L20, N-H30L30, N-H30L40, N-H30Y20, N-H30Y30, N-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerin kendi içinde yapılan kıyaslaması gösterilirken, Şekil 4.123(b)'de birbirleri arasında yapılan karşılaştırmalar gösterilmektedir.

Tablo 4.8. Mikron ve nano boyutta HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı alternatif biyo-greftlerin mikrosertlik değerleri.

Biyo-Greftlerin Kodları	**HV (GPa)**
M-H30S20	6,12564
M-H30S30	6,313256
M-H30S40	6,874169
M-H30L20	3,478363
M-H30L30	2,805892
M-H30L40	5,244019
M-H30Y20	3,339243
M-H30Y30	3,145706
M-H30Y40	2,968519
N-H30S20	4,750751
N-H30S30	4,529816
N-H30S40	6,313256
N-H30L20	5,976611
N-H30L30	4,040484
N-H30L40	5,379343
N-H30Y20	4,040484
N-H30Y30	4,529816
N-H30Y40	6,313256



(a) (b)

Şekil 4.123. HA esaslı ve farklı konsantrasyonlarda yumurta kabuğu, lületaşı ve sübye kemiği katkılı alternatif biyo-greftlerin (a) Kendi içlerinde ve (b) Birbirleri arasında yapılan Vickers mikrosertlik karşılaştırma grafiği.

Mikron boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y20, M-H30Y30 ve M-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerde yumurta kabuğu miktarı arttıkça sertliğinin düştüğü görülmektedir. Nano boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı (N-H30Y20, N-H30Y30 ve N-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerde ise, tam tersinin olduğu ve yumurta kabuğu miktarı arttıkça sertliğin arttığı ve en yüksek sertliği N-H30Y40 kodlu biyo-greftin verdiği görülmektedir. Lületaşı katkılı biyo-greftlerde ise nano boyutta HA esaslı biyo-greftlerin mikron boyutta HA esaslı biyo-greftlerden daha yüksek sertlik değeri verdiği görülürken kendi içlerinde benzer sonuçlar verdiği de görülmektedir. Böylece mikron boyutta HA esaslı (M-H30L20, M-H30L30 ve M-H30L40 kodlu) biyo-greftlerde nano boyutta HA esaslı (N-H30L20, N-H30L30 ve N-H30L40 kodlu) biyo-greftlerde olduğu gibi en düşük sertlik değerini %30 lületaşı (N-H30L30 kodlu) katkılı biyo-greftin verdiği belirlenmiştir.

Mikron ve nano boyutta HA esaslı lületaşı katkılı biyo-greftler kıyaslandığında, mikron boyutta HA esaslı biyo-greftlerde en yüksek sertlik değerini %40 lületaşı katkılı (N-H30L40 kodlu) biyo-greftin verdiği, nano boyutta HA esaslı biyo-greftlerde ise en yüksek sertlik değerini %20 lületaşı katkılı (N-H30L20 kodlu) biyo-greftin verdiği Şekil 4.123(a)'da belirlenmiştir. Mikron boyutta HA esaslı ve %20-40 sübye kemiği katkılı biyo-greftlerde ise, sübye kemiği miktarı arttıkça sertlik değerinin arttığı görülürken, nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde farklı olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak, en yüksek sertliği nano boyutta %30 HA esaslı ve %40 sübye kemiği katkılı (N-H30S40 kodlu) biyo-greftin verdiği, en düşük sertliği de %30 HA esaslı ve %30 sübye kemiği katkılı (N-H30S30 kodlu) biyo-greftin verdiği gözlenmektedir.

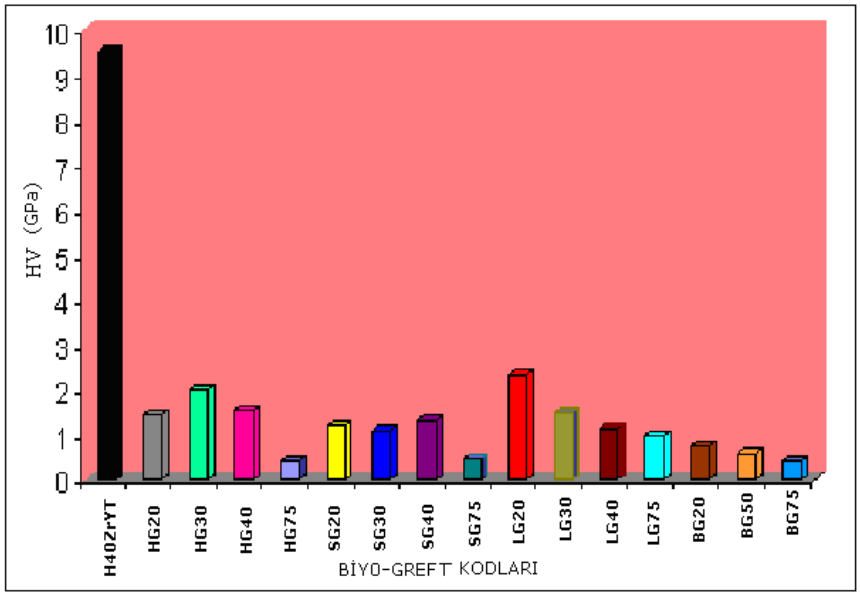
Şekil 4.123(b)'de mikron ve nano boyutta HA esaslı biyo-greftlerde yumurta kabuğu, lületaşı ve sübye kemiğinin HA'in sertliği üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucu bütün biyo-greftler kıyaslandığında, en yüksek sertlik değerini mikron boyutta HA esaslı ve %40 sübye kemiği katkılı (M-H30S40 kodlu) biyo-greftin verdiği görülmektedir. Mikron boyutta HA esaslı ve %20, %40 yumurta kabuğu, lületaşı ve sübye kemiği içerikli biyo-greftlerde benzer sonuçlar gözlenmektedir. Buna bağlı olarak, en yüksek sertliği mikron boyutta HA esaslı ve %20, %40 sübye kemiği katkılı (M-H30S20 ve M-H30S40 kodlu) biyo-greftlerin verdiği, en düşük sertliği de mikron boyutta HA esaslı ve %20, %40 yumurta kabuğu katkılı (M-H30Y20 ve M-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerin verdiği görülmektedir. Mikron boyutta HA esaslı ve %30 yumurta kabuğu, lületaşı ve sübye kemiği katkılı (M-H30S30, M-H30L30 ve M-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerde ise, en yüksek sertliği sübye kemiği katkılı (M-H30S30 kodlu) biyo-greftler verirken, en düşük sertliği lületaşı katkılı (M-H30L30 kodlu) biyo-greft vermektedir. Nano boyutta HA esaslı ve %30, %40 yumurta kabuğu, lületaşı ve sübye kemiği katkılı (N-H30S30, N-H30L30, N-H30Y30, N-H30S40, N-H30L40 ve N-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerde en düşük sertliği lületaşı katkılı (N-H30L30 kodlu) biyo-greftin verdiği görülürken yumurta kabuğu ve sübye kemiği katkılı (N-H30S30 ve N-H30Y30 kodlu) biyo-greftlerin sertliklerinin birbirine yakın olduğu da Şekil 4.123(b)'de tespit edilmektedir. Nano boyutta HA esaslı ve %20 yumurta kabuğu, lületaşı ve sübye kemiği katkılı (N-H30S20, N-H30L20 ve N-H30Y40 kodlu) biyo-greftlerde ise tam tersi olduğu ve lületaşı katkılı (N-H30L20 kodlu) biyo-greftin en yüksek sertliği verdiği, en düşük sertliği de yumurta kabuğu katkılı (N-H30Y20 kodlu) biyo-greftin verdiği görülmektedir.

4.5.3. IV. Grup (Poroz Yapıda HA, Biocam, Sübye Kemiği ve Lületaşı Tozu Esaslı) Biyo-Greftlerin Sertlik Testleri

HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftlerin poroz yapıya sahip olmasını sağlamak amacıyla farklı oranlarda jelatin ilave edilmiştir. %20, 30, 40 ve 75 oranlarında jelatin ilave edilerek üretilen biyo-greftlerin mekanik özelliklerini incelemek için basma deneyiyle birlikte sertlik ölçümleri de yapılmıştır. Bunun için HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı ve farklı konsantrasyonlar da jelatin içerikli (H30G20, H30G30, H30G40, H10G75, S30G20, S30G30, S40G40, S13G75, L40G20, L40G30, L40G40, L10G75, B40G20, B25G50 ve B10G75 kodlu) biyo-greftlere 5 sn'de 20kgf yük altında vickers mikrosertlik deneyi yapılmıştır.

Tablo 4.9. Poroz yapıya sahip alternatif biyo-greftlerin Vickers mikrosertlik değerleri.

Biyo-Greft Kodları	H40 ZrYt	H30 G20	H30 G30	H30 G40	H10 G75	S30 G20	S30 G30	S30 G40	S13 G75	L40 G20	L40 G30	L40 G40	L10 G75	B40 G20	B25 G50	B10 G75
HV (GPa)	9,53	1,47	2,00	1,53	0,44	1,23	1,11	1,34	0,46	2,36	1,50	1,15	0,98	0,75	0,60	0,43



Şekil 4.124. HA esaslı ve farklı konsantrasyonlarda jelatin katkılı alternatif biyo-greftlerin Vickers mikrosertlik karşılaştırma grafiği.

HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı ve farklı konsantrasyonlarda jelatin katkılı (H30G20, H30G30, H30G40, H10G75, S30G20, S30G30, S40G40, S13G75, L40G20, L40G30, L40G40, L10G75, B40G20, B25G50 VE B10G75 kodlu) biyo-greftlerin Vickers mikrosertlik değerleri ve grafiğini Tablo 4.9 ve Şekil 4.124'de verilmektedir. Poroz ve kompakt yapıdaki biyo-greftleri karşılaştırmak amacıyla, poroz yapıda olmayan %40 HA esaslı ve Zr ile Yttria içerikli (H40ZrYt kodlu) biyo-greft üretilmiştir. Yapılan sertlik deneyi sonucu, en yüksek sertlik değerini H40ZrYt kodlu poroz yapıya sahip olmayan biyo-greftin verdiği görülmektedir. Poroz yapıya sahip biyo-greftlerin sertlik değerleri karşılaştırıldığın da, en yüksek sertlik değerini 2,36 GPa değeriyle %40 lületaşı esaslı ve %20 jelatin katkılı (L40G20 kodlu) biyo-greftin verdiği ve en düşük sertlik değerini de 0,43 GPa değeriyle %10 biyocam esaslı ve %75 jelatin katkılı (B10G75 kodlu) biyo-greftin verdiği gözlenmektedir.

HA esaslı ve %20, 30, 40, 75 jelatin katkılı (H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75kodlu) biyo-greftler de jelatin oranıyla doğru orantılı olarak sertlik değeri değişmediği gözlenirken, en yüksek sertlik değerini H30G30 kodlu biyo-greftin (2,00 GPa) verdiği ve en düşük sertlik değerini de H10G75 kodlu biyo-greftin (0,44GPa) verdiği görülmektedir. Sübye kemiği esaslı biyo-

greftlerde de HA esaslı biyo-greftler de olduğu gibi jelatin oranıyla doğru orantılı olarak sertlik değerlerinin değişmediği gözlenmektedir. Sübye kemiği esaslı jelatin katkılı biyo-greftler de en yüksek sertlik değerini S30G40 kodlu biyo-greftten elde edildiği, en düşük sertlik değerini de S13G75 kodlu biyo-greftten elde edildiği tespit edilmiştir. Lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftlerin sertlik deneyin de benzer sonuçlar gözlendiği Tablo 4.9 ve Şekil 4.124'de görülmektedir. Böylece lületaşı esaslı biyo-greftler de jelatin miktarıyla sertlik değerlerinin ters orantılı olduğu ve jelatin miktarı arttıkça sertlik değerinin düştüğü belirlenmiştir. Lületaşı ve biyocam esaslı ve jelatin içerikli biyo-greftler karşılaştırıldığında, lületaşı esaslı biyo-greftlerin biyocam esaslı biyo-greftlerden daha yüksek sertlik değeri verdiği gözlenmiştir. Buna bağlı olarak da en yüksek sertlik değerini 2,36 GPa değeriyle L30G20 kodlu biyo-greftin, en düşük sertlik değerini de 0,43 GPa değeri ile B10G75 kodlu biyo-greftin verdiği görülmektedir.

4.6. İn Vivo Canlı Hayvan Deneyleri

Yapılan çalışma, tavşan tibialarının proksimaline hem matkapla delik açarak hemde yine tibia da boşluk (gap) bölgesi oluşturularak yapılan operasyonlar Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 24.03.2010-2010/7-29 sayılı onay alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın materyalini ortalama 6.2 aylık (dağılım 5-8 ay) ortalama ağırlığı 3240 gr (min 2900-max 3400 g) olan 24 adet Yeni Zelanda tavşanı oluşturmuştur. Operasyon için kullanılan anestezi, tavşanlara, 10 mg/kg dozunda % 2'lik Xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer), ile 40 mg/kg dozunda % 10'luk Ketamine HCL (Ketamidor, Richter Pharma) İM kimyasal bileşimine sahiptir. Anestezi sonrası postoperatif hazırlık için, operasyon bölgeleri, antebrachium ve tibia'nın alt ve üst eklemini içine alacak şekilde traş ve dezenfekte edilerek hazırlanmıştır. Dezenfeksiyon için deri antiseptikleri benzalkonyum klorür %10 (Zefiran®, Vilsan), povidon iyodür %10 (Biokadin®, Adeka) kullanılmıştır. Bölge steril örtülerle sınırlandırılmıştır.

Sterilizasyon sonrası ulna'da defekti oluşturulmak için, tavşanlar, operasyon masası üzerine sol bacak üste gelecek şekilde yan yatırılarak operasyon bölgesi tespit edilmiştir. Deri, olecranon'dan altından başlayarak distal ulna'ya kadar lateral yaklaşımla 5-6 cm bir alanda operasyon (enzisyon) yapılmış ve subcutan fascianın ensizyonu ile deri kenarlarının retraksiyonu lateralde m. extensor carpi ulnaris ve cranialde m. extensor digitalis lateralis tendonu açığa çıkarılmıştır (Şekil 4.125 (a-c)). Profound antebrachia fascia bu iki tendon arasında kemik üzerine periostu da içine alacak şekilde ensize edilmiş ve antebrahial fascia'nın kemiğe olan bağlantısı subperiostal elevasyonla giderildikten sonra, m. extensor carpi ulnaris caudolaterale retrakte edilmiştir (Şekil 4.125 (d)). M. extensor digitalis lateralis, extensor pollici longus ve abductor pollicis longus subperiostal olarak kaldırılmış ve craniale retrakte edilerek tibiadaki kemiğin şaftı

açığa çıkarılmıştır. Bu işlemler sırasında M.fleksor digitalis profundus kemiğin caudaline uzanır ve gerekli olduğunda retrakte edilmiştir [213]. Açığa çıkarılan ulna'nın orta diyafiz bölgesinde segmental bir defekt oluşturulmuştur (GAP açılmıştır).

3.2.mm uzunluğunda ve genişliğinde boşluk (GAP) defektleri oluşturulduktan sonra, 1. gruptaki defekt alanı boş bırakılmış ve kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. İkinci grupdaki tibial kemik defektlerine ticari greft doldurulmuştur. Diğer gruplarda Yeni Zelenda tavşanlarının defekt bölgelerine sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz ve yüksek sıcaklıklarda sinterlediğimiz H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftler yerleştirilmiştir. Üçüncü grup tavşanlara H60, 4. grup tavşanlara H30Ca, 5 ve 6. grup tavşanlara da H50Y10 ve N1-7 kodlu alternatif biyo- greftler yerleştirilmiş ve defektlerin onarımı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Tibia üzerine açılan deliklere greft yerleştirmek amacıyla yapılan operasyonda, tibianın proksimal medial yüzeyinde 4 cm'lik bir deri ensizyonu yapılmış ve deri altı dokular ayrıldıktan sonra tibianın proksimal alanına ulaşılmıştır. Bu alanda 3,2. mm çapında 2 adet delik açılarak greftler her iki deliğe doldurulmuş ve tek tavşan üzerinde 2 delikte greftin kaynama, doldurma hızı ve kapasitesi incelenmiştir (Şekil 4.125 (a-d)). Bunun için 6 Yeni Zelanda tavşanı kullanılmıştır. 1. gruptaki tavşan defekt alanı boş bırakılıp, kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. İkinci gruptaki tavşan defektine ticari greft yerleştirilerek kontrol grubuyla (1. grup) birlikte ürettiğimiz HA sentez (N1-7 kodlu) biyo-grefti ve HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftler karşılaştırılmıştır. 3-6. gruptaki tavşan tibia defektlerini doldurmak için sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz (H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu) biyo-greftler kullanılarak hem HA sentez biyo-greftleri hemde HA esaslı biyo-greftlerin kemik defektinin onarımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu nedenle 3. grupta %60 HA esaslı (H60 kodlu), 4. grupta %30 HA esaslı ve CaO katkılı (H30Ca kodlu), 5. grupta %50 HA esaslı ve %10 Yttria katkılı (H50Y10 kodlu), 6. grupta ise pH değeri 7 olan N1-7 kodlu biyo-greftler tibia da açılan deliklere yerleştirilerek biyouyumlulukları incelenmiştir.

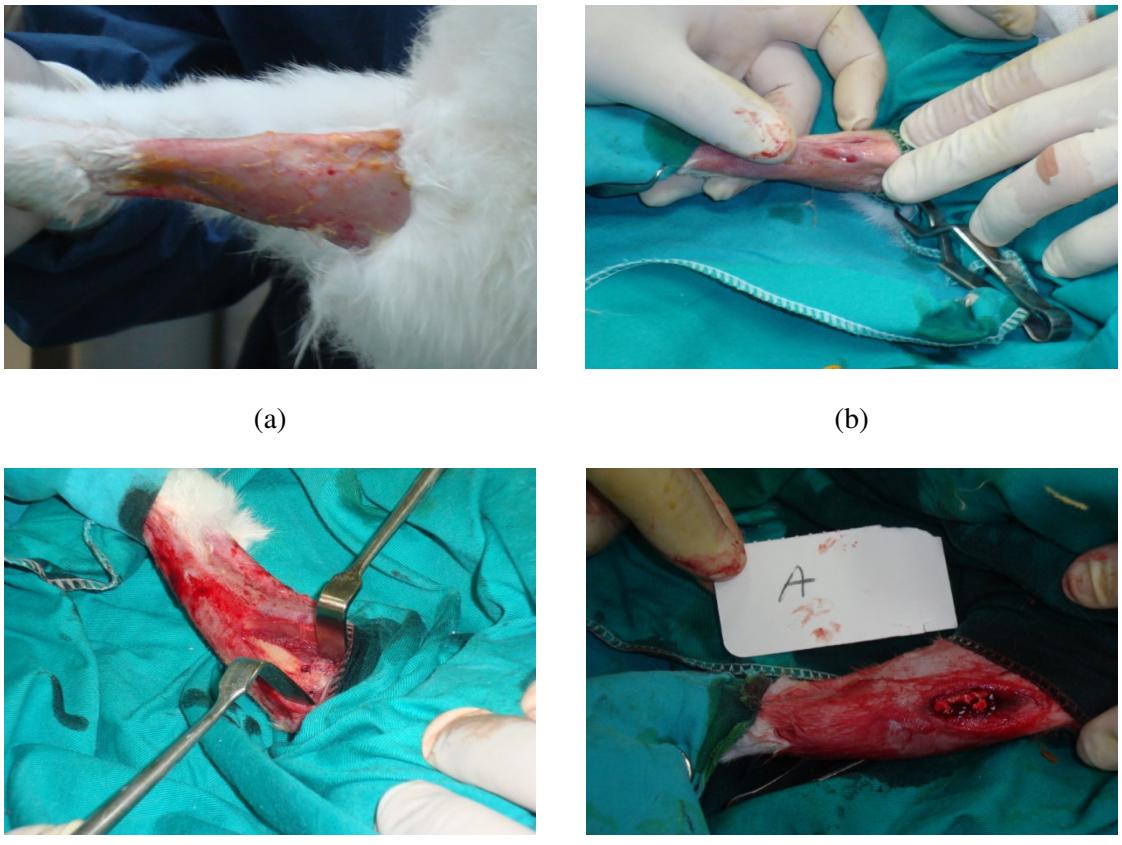
Defektler mevcut greftlerle doldurulduktan sonra, operasyon bölgeleri Subcutan fascia dokuları 3/0 polyglytone iplikler (Caprosyn, Tyco Healthcare, UK) ile sürekli, deri ise 2/0 ipek ipliklerle (Neosilk, SSM, İstanbul/Türkiye) basit ayrı dikişlerle kapatılmıştır. Operasyondan sonra yara bölgesine Kristapen 1.000.000 IU (Penisilin G potasyum kristalize, Deva, İstanbul) uygulanmıştır. Sol bacak dikiş bölgesi pansuman ile kapatılarak hayvanların hareketlerinin sınırlandırılması engellenmiştir. Böylece hayvanların serbestçe gezmelerine müsaade edilmiştir.

Operasyon sonrası postoperatif kontroller, hayvanlara 3 gün süreyle 20 mg/kg Cefazolin sodium (cefamezin 500 mg, Eczacıbaşı, Turkey) ve 3mg/kg ketoprofen (profenid 100 mg, Eczacıbaşı, İstanbul, Turkey) kullanılarak yapılmış ve dikişler 8 ve 12. günler de kontrollere alınmıştır. Olguların sekiz haftalık postoperatif (ameliyat sonrası) takip süresinde klinik kontrolleri

günlük, radyografik kontrolleri ise 60 günlük süre içerisinde 15 günlük ara ile Canon CXDI-50G röntgen cihazı kullanılarak yapılmıştır. 60 günlük postoperatif takip süresi sonunda tavşanlara CO solutularak ötenazi yapılmıştır. Alınan doku örnekleri Biyomekanik testler için F.Ü.Teknik Eğitim Fakültesi Malzeme Laboravurlarında ve histopatolojik incelemeleri için ise F. Ü.Tıp Fak. Patoloji ABD laboratuvarlarında yapılmıştır.

4.6.1. I ve II. Gruptaki (H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu)Biyo-Greftlerin İn Vivo Deneyinin (Delik Açılarak) Operasyon İşlemleri

Şekil 4.125(a-d)'de 3.2mm çaplı ayarlı matkapla ve 230 devir/sn hızla Yeni Zelenda tavşanlarının tibialarının proksimaline açılan delikler ve deliklere yerleştirilen Ticari greft, H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin operasyon görüntüleri verilmiştir. Çalışmalarda yetişkin dişi Yeni Zelanda tavşanları kullanılmıştır. Şekil 4,125 (a)'da tavşanların sol tibialarındaki operasyon bölgesinin standart operasyon hazırlıkları gösterilmektedir. Şekil 4.125(b)'de operasyon bölgesinin tespit edilmesi, Şekil 4.125(c)'de operasyon bölgesi ve Şekil 4.125(d)'de tibianın proksimaline açılan 3.2 mm çaplı deliğe yerleştirilen greftlerin görüntüleri verilmektedir.



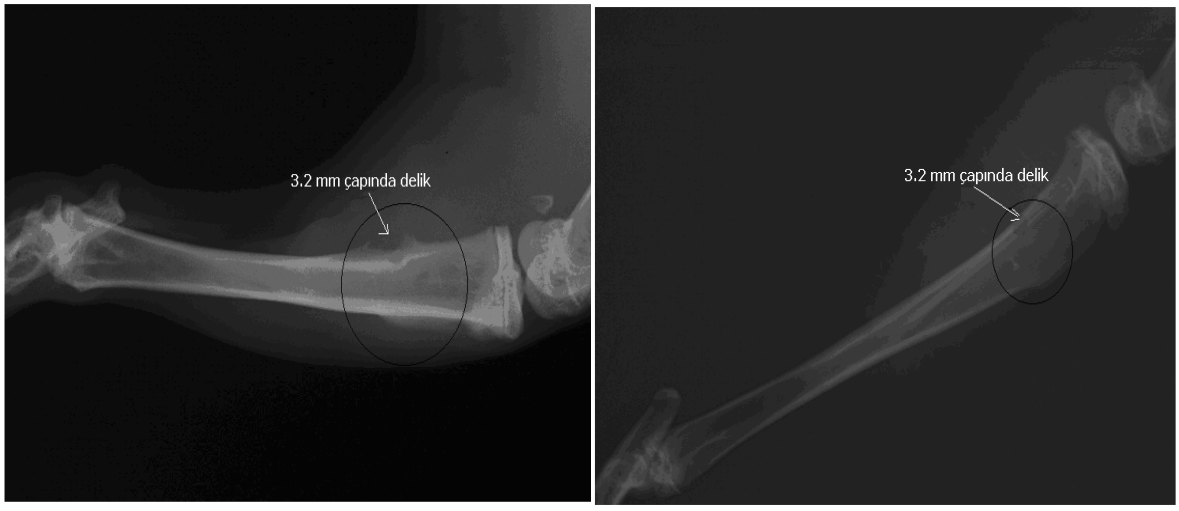
(a) (b)

(c) (d)

Şekil 4.125. H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin delik açılarak yapılan in vivo deneyleri sırasında ki operasyon görüntüleri.

Yapılan incelemelere bağlı olarak, HA esaslı biyo-greftler üretilip hem HA'in biyouyumluluğundan yararlanılmaya çalışılırken, KH_2PO_4, CaO, P_2O_5, Na_2CO_3 ve Yttria gibi bileşikler kullanılarak da üretilen biyo-greftlerin kimyasal bileşimi kemiğin kimyasal bileşimine yakın olması, sinterlenebilirliği arttırmaya ve daha uygun fiyatta üretimi kolaylaştırılmaya çalışılırken mekanik özellikleri de arttırılmaya çalışılmıştır. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarının proksimalinde açılan 3.2 mm çapında boşluklara greft yerleştirilmeden, piyasada kullanılan ticari greft konularak ve ürettiğimiz H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftler yerleştirilerek karşılaştırma yapılmıştır. Şekil 4.126(a-c)-Şekil 4.133(a-d)'de 60 günlük iyileşme süreci içerisinde, operasyon günü ile birlikte 15 gün arayla yapılan röntgen çekimi sonuçları verilmiştir. Böylece greftlerin kemik defektlerinin onarımı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

(a)

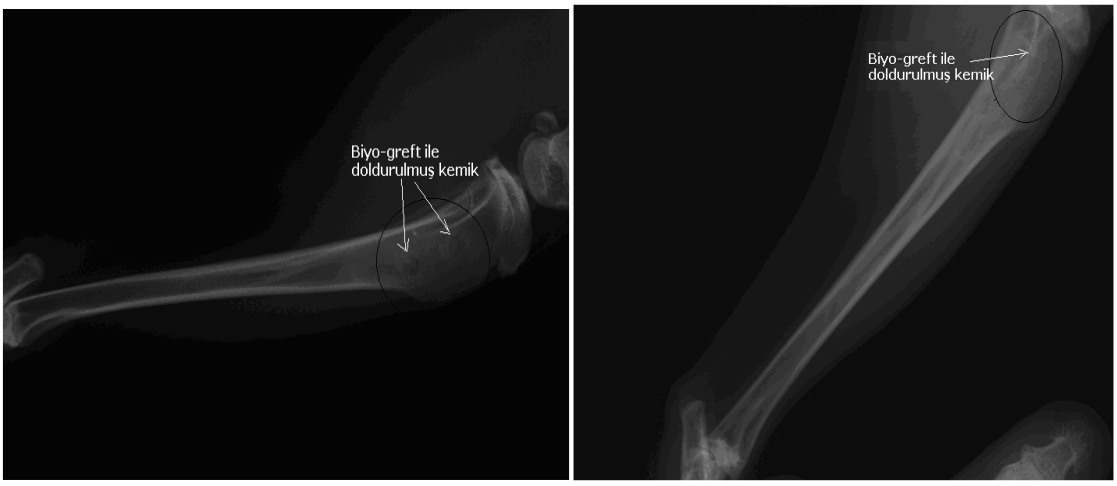


(b) (c)

Şekil 4.126. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklerin boş bırakıldığı kontrol grubunun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c) 60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Şekil 4.126 (a-c)'de tavşan tibialarının proksimalinde açılan delikleri boş bırakılarak oluşturulan kontrol grubunun (1. grup) operasyon günü ile 30. ve 60. günlerdeki röntgen görüntülerinin genel görüntüsü ve her operasyon bölgesinin yakınlaştırılmış görüntüsü verilmektedir. Şekil 4.126 (a)'da operasyon günü tavşanların sol tibialarından çekilen genel ve yakınlaştırılmış röntgen görüntüleri verilmiştir. Tavşanların tibialarında tam bir analiz yapabilmek için röntgenlerde görüldüğü gibi aynı çapta iki delik açılmıştır. Şekil 4.126 (b)'deki röntgen görüntüsüne göre, 30. günde alınan kısmi bir iyileşmenin oluştuğu ve iç kısımda açılan deliğin kemiğin sınırında açılan delikten daha fazla kapandığı gözlemlenmektedir. Şekil 4.126 (c)'de verilen 60. gün çekilen röntgenlerde, 30. gün görülen etkinin aynısının görüldüğü, ancak iç kısımdaki ikinci deliğin kemiğin kenarındaki delik boyutuna göre daha küçük olduğu görülmüştür. Ayrıca gün geçtikçe de her iki deliğin kapandığı, fakat tavşanlara ötenazinin yapıldığı 60. günün sonunda deliklerin tam olarak kapanmadığı net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.126 (b,c)).

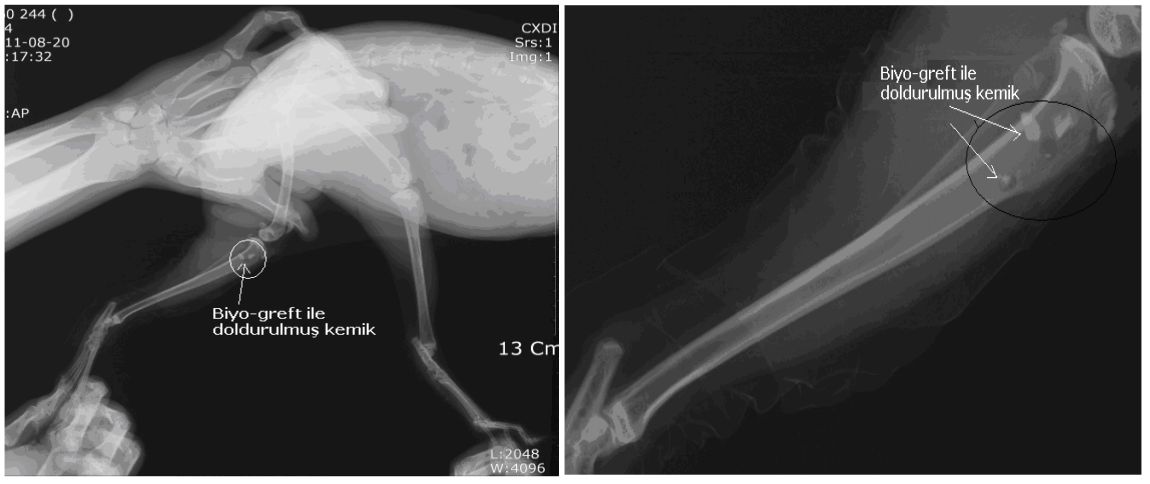
(a)



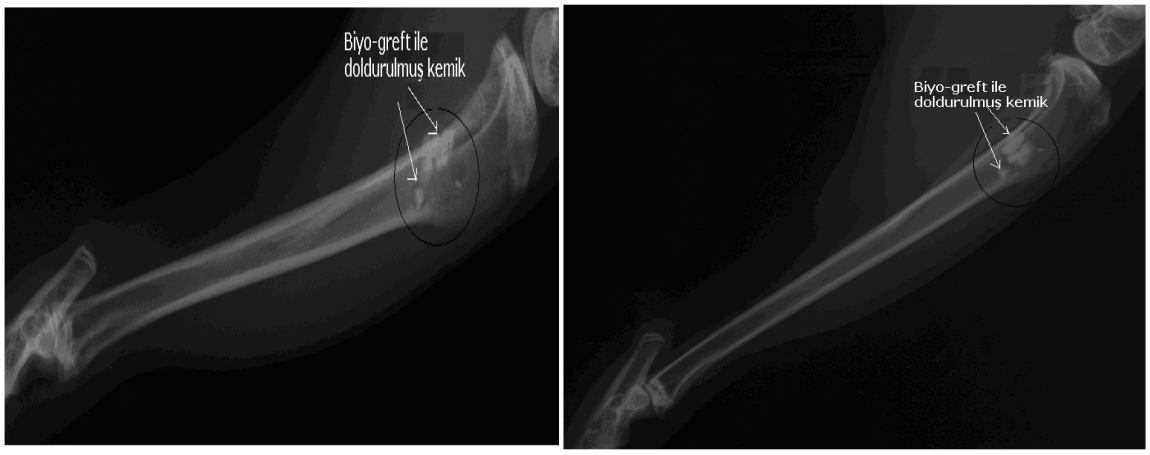
(b) (c)

Şekil 4.127. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere ticari greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) ameliyat günü, (b)30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Şekil 4.127 (a-c)'de Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan boşluklara doldurulan ticari greftin (2. grup) operasyon günü-60. günlerde alınan röntgen görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.127 (a)'da operasyon günü çekilen röntgen sonuçları verilirken, açılan çift deliklere yerleştirilen ticari greft görülmektedir. Şekil 4.127 (b) operasyon sonrası 30. gün tavşanlardan alınan röntgen sonuçları verilmektedir. Genel olarak ve yakınlaştırılmış röntgen görüntülerinde görülen deliklerin dolmaya ve onarılmaya başlandığı görülmüştür. Şekil 4.127 (c)'de verilen 60. gün çekilen röntgen görüntüsü sonucu, tibiada açılan deliğin ve özellikle de eklem bölgesine yakın açılan (proksimaldeki) deliğin tamamen kapandığı röntgen sonuçlarında görülmektedir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında, ticari greft kullanılarak kapatılmaya çalışılan deliklerde yeni kemik oluşumunun daha önce oluştuğu ve 60. gün sonunda deliklerin daha iyi kapandığı tespit edilmiştir.



(a)

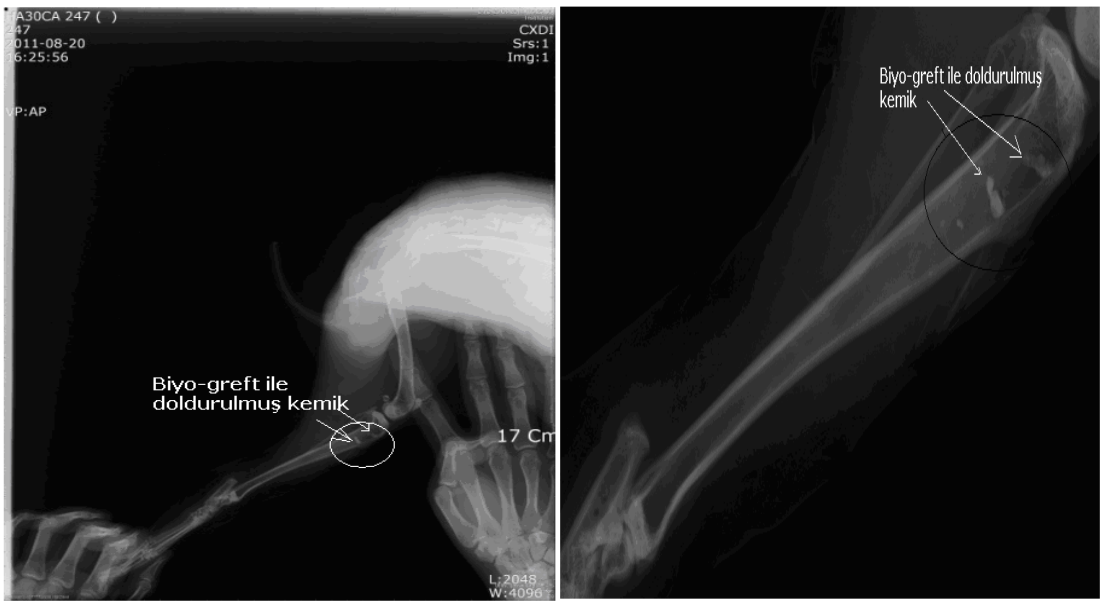


(b) (c)

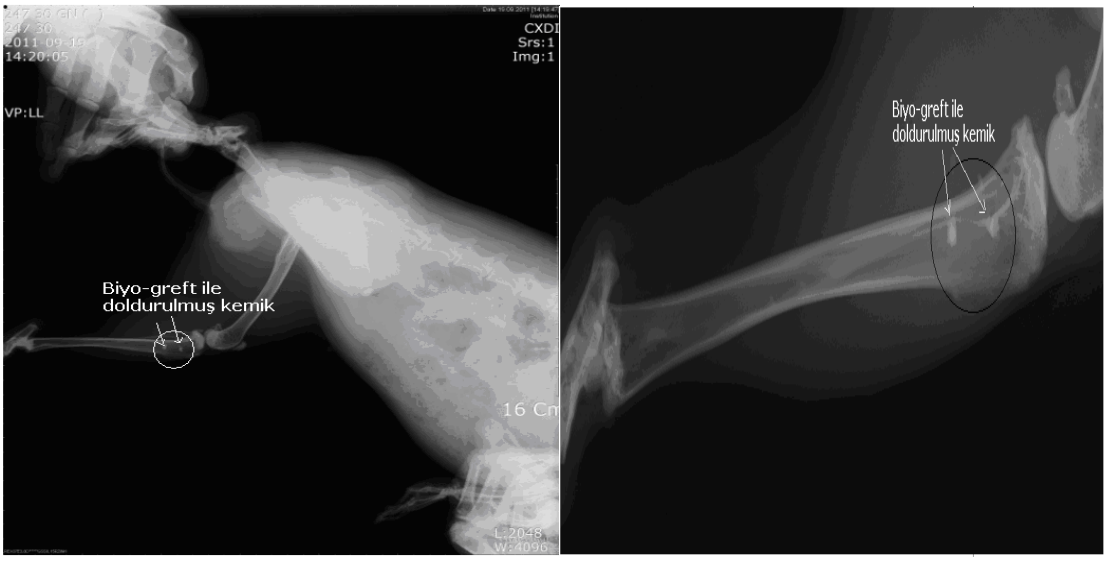
Şekil 4.128. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere H60 kodlu alternatif biyo-greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) ameliyat günü, (b) 30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu gerek ortopedide gerekse maksillofasyal (yüz) cerrahide çözüm bekleyen ve üzerinde yoğun çalışılmakta olan bir konudur. Kemik defektlerinin tamirinde otogreftler etkin bir çözüm olmakla beraber otogreftin elde edilmesi ek morbidite ve komplikasyonları birlikte getirmektedir [218-220]. Aynca otogreftlerde miktar yönünden her zaman sınırlanma mevcuttur. Allogreftler ise enfeksiyon hastalıklarının taşınımı riskine sahiptirler ve bunu önlemek için uygulanan sterilizasyon yöntemleri allogreftlerin biyolojik özelliklerinden fedakarlık gerektirir. Bu nedenle günümüzde greftlere alternatif olarak demineralize kemik matriksi (DKl, mercan kaynaklı hidroksiapatit (MKI), biyoaktif camlar ve seramikler, değişik matrikslere emdirilmiş kemik morfojenik proteini ve kalsiyum sülfat dihidrat (ortopedik alçı, plaster of Paris) (KSD) gibi ek morbiditeye neden olmayan ve istenildiği kadar elde edilebilen biyomalzemeler mevcut olup bu materyaller ile çok sayıda klinik ve deneysel çalışmalar devam etmektedir [219,221-223].

Şekil 4.128 (a-c) H60 kodlu alternatif biyo-greftin tavşan tibiasına açılan 3.2 mm çapında iki deliğe yerleştirilen H60 kodlu greftin (3. grup) 30 gün ara ile çekilen röntgen görüntüleri verilmektedir. Şekil 4.128 (a) H60 kodlu biyo-greftin operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünü verirken, görüntüden greftin tam olarak kemikte oluşturulan deliğe yerleştirilmediği görülmüştür. 30. gün çekilen röntgen görüntüsünde greftin tam anlamıyla deliklere yerleştiği Şekil 4.128 (b)'de tespit edilmiştir. Şekil 4.128 (c) tavşanlara yapılan ötenazi günü (60.gün) çekilen röntgen görüntülerini vermekte olup, deliklere yerleşen greftlerin delikleri tam doldurdugu, ayrıca yeniden kemik oluşumunu sağlamaya başladığından dolayı deliklerin küçüldüğü belirlenmiştir.



(a)



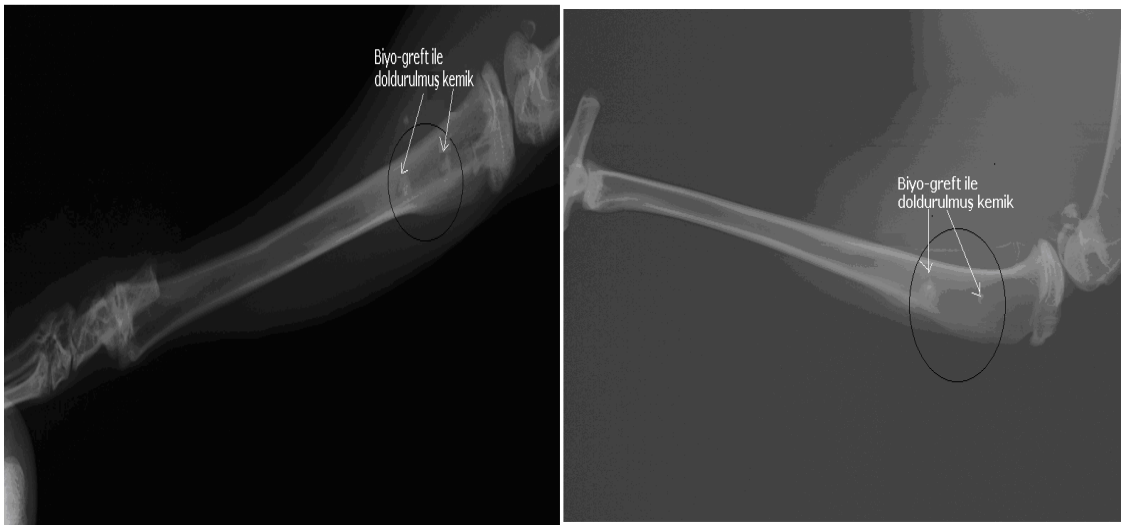
(b) (c)

Şekil 4.129. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere H30Ca kodlu alternatif biyo-greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) ameliyat günü, (b) 30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Şekil 4.129 (a-c) H30Ca kodlu biyo-greftin (4. grup) in vivo deneyi sırasında alınan röntgen görüntülerini vermektedir. Şekil 4.129(a) operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünü vermekte olup, tavşan tibiasının proksimaline açılan iki deliğin tam olarak greft ile doldurulup tamir

edildiğini göstermektedir. 30. gün defektlerde belirgin bir küçülme ve doluş olmakla birlikte bütün defekt bölgesi görülmektedir(Şekil 4.129(b)). 60. gün defektlerin boyutlarındaki küçülme devam ederken, defektlerin görünümünde silikleşme başladığı, fakat defektlerin gözlemlenebildiği de Şekil 4.129(c)'de tespit edilmektedir.

(a)

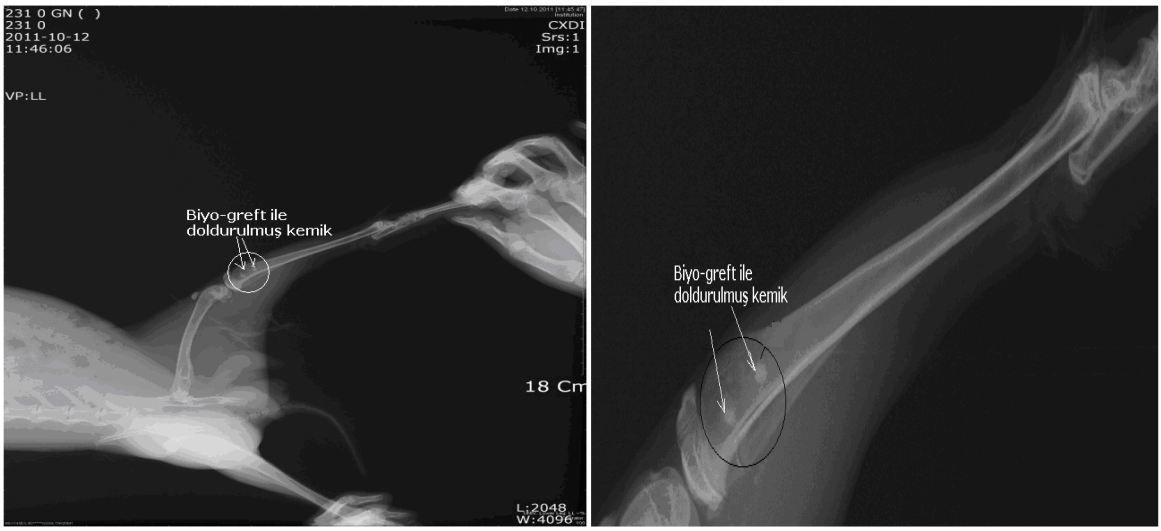


(b) (c)

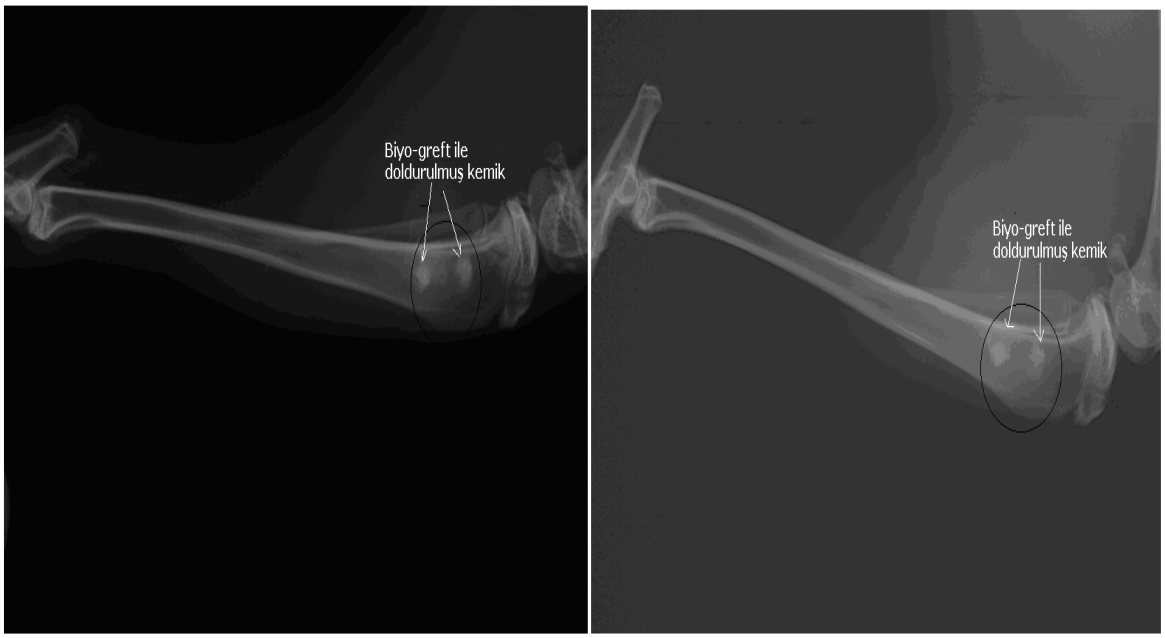
Şekil 4.130. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere H50Y10 kodlu alternatif biyo-greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b)30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

İskelet sistemini oluşturan kemik dokusunun hastalık, travma ve cerrahi nedenlerle oluşan defektlerinin giderilmesi, fonksiyonunun geri döndürülmesi yönünden önemlidir. Bu defektler uzun kemiklerde fonksiyonel kusurlar yaparken yüz ve kafatası kemiklerinde hem fonksiyonel hemde kozmetik kusurlara neden olurlar. Defektlerin doldurularak iyileşmenin sağlanması için kemik greftleri yaygın olarak kullanılmaktadır [224]. Alternatif biyo-greft üretiminde göz önünde bulundurulması gereken bir diğer özellikte greftin mekanik özelliğidir. İskelet sistemi iç organları koruyan, saglam bir kinematik link oluşturan, kaslarla yapımsal yeri saglayan ve bu sayede vücut hareketlerini destekleyen bir yapıdır. Kemigin biyomekanigi de bu kompleks görevleri yapabilmesi için özelleşmiştir. Kemik, kendini tamir edebilen, içl yapısını ve konfigürasyonunu degişen mekanik ihtiyaçlara göre ayarlayabilen bir dokudur. Uzun süre devam eden aşırı yüklenme ya da az yüklenme mutlaka kemik yoğunluğunu degiştirir[56]. Bu nedenle alternatif biyo-greft üretirken sadece kemiğin kimyasal bileşimine benzer greftler üretilmez, mekanik özellikleriyle de kemiğe benzer greftler üretilmeye çalışılır. Bu alanda metal, seramik ve polimer bileşiklerinden faydalanılır. Alternatif biyo-greft üretiminde kullanılan seramiklere farklı bileşikler ilave etmek tane sınırlarında hataların oluşmasına neden olur. Bu nedenle seramikler pekleştirilerek bu hatalar engellenmeye çalışılır. Seramikleri pekleştirmenin bir metodu tanecikleri ve tanecik sınırlarını, çatlakların sınıra doğru gitmesini ve tanecik tarafından emilmesine yol açacak şekilde işlemektir. Başka bir yöntem ise yttria ve magnezyum, kısmen stabilize edilmiş zirkonya gibi bileşikleri gerilme faz transformasyonuyla indükleyip çatlak oluşumunu engellemektir [56].

Yapılan çalışmada, HA esaslı biyo-greftlere mekanik özellikler ve morfolojik etkileri incelemek amacıyla Y_2O_3 gibi elementler ilave edilerek biyo-greftler üretilmiştir. İn vivo deneyler sırasında çekilen röntgen görüntülerine göre, Yttria tozu katkılı biyo-greftlerin sadece mekanik özellikleri değil kemikteki defektleri de daha iyi kapattığı Şekil 4.130(a-c)'den görülmektedir. Şekil 4.130 (a) H50Y10 kodlu biyo-greftin (5. grup) operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünü vermektedir. Görüntüden operasyon sırasında deliklerin tamamen H50Y10 kodlu greft ile doldurulduğu görülmektedir. 30. gün sonunda ise defeklerin boyutlarının küçüldüğü net bir şekilde gözlenmektedir(Şekil 4.130(b)). Şekil 4.130(c)'de tavşanlara yapılan ötenazi günü (60. gün) çekilen röntgen görüntüleri verilmektedir. Görüntüde tavşanların sol tibialarında açılan defektlerin, özellikle de proksimaldeki defektin büyük bir kısmının kapandığı ve operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünde görülen büyüklükteki defektin sadece küçük bir kısmının görüldüğü, dolayısı ile H50Y10 kodlu biyo-greftin kemik defekti onarımını arttırdığı gözlenmiştir.



(a)



(b) (c)

Şekil 4.131. Yeni Zelanda tavşanlarının tibialarında açılan deliklere N1-7 kodlu alternatif biyo-greft yerleştirilerek yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c) 60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Hidroksiapatit (HA:$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) insan doku implantasyonları için önem taşıyan bir malzemedir. HA insan iskelet sistemindeki apatite benzer bir kimyasal bileşime ve kristal yapıya sahiptir. Bu nedenle kemik yerine kullanımda veya yeniden yapılandırma için uygun bir malzemedir. HA sert vücut dokuları, cilt ve kas dokularıyla mükemmel bir biyouyumluluk gösterir. Ayrıca toksit oluşturmaz ve kemiğe direkt olarak bağlanabilir. Bu nedenle HA sert doku implantları için en uygun seramik malzeme olarak görülmektedir[225,226].

Yapılan çalışmada, kalsiyum hidroksit ve fosforik asit kullanılarak HA üretilmiş ve piyasada bulunan ticari HA greftleriyle ve ürettiğimiz alternatif biyo-greftlerle karşılaştırılmıştır. N1-7 koduyla isimlendirilen pH değeri 7 olan HA sentez biyo-grefti tavşanların sol tibialarında oluşturulan 3.2mm çapındaki defektlere yerleştirilerek in vivo deneyi yapılmış ve kontrol grubu, ticari greft ile HA esaslı biyo-greftlerle kıyaslanmıştır. N1-7 kodlu greftin in vivo deneyi sırasında çekilen röntgen görüntüleri Şekil 4.131 (a-c)'de verilmektedir. Şekil 4.131 (a) operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünü vermekte olup greftin defektlere tam doldurulduğunu göstermektedir. 30. gün defektlerde yeni kemik oluşumunun başladığı ve defekt boyutununda az miktarda küçüldüğü Şekil 4.131(b)'de tespit edilmiştir. 60. gün çekilen röntgen görüntüsü özellikle diğer in vivo deney numunelerinden farklı olarak eklem bölgesine yakın defekttin değilde, iç bölgedeki defektin daha çok küçüldügü, defektlerin silikleşmeye başladığı, fakat hala N1-7 kodlu biyo-greft ile doldurulan defektin net bir şekilde görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 4.131 (c)).

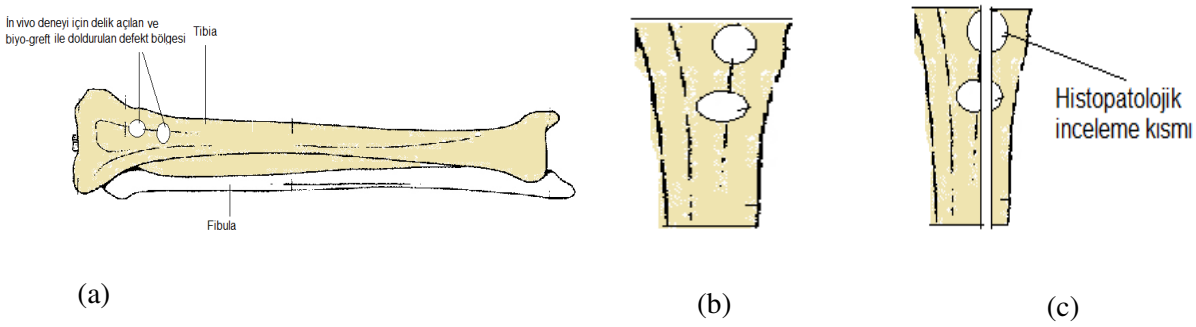
Kontrol grubu, ticari greft ve sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA sentez (N1-7 kodlu) biyo-grefti ile HA esaslı (H60- H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerin in vivo deneyinde 60. gün sonunda çekilen röntgen görüntüleri kıyaslandığında, en iyi röntgen görüntüsünü birbirine yakın görüntüler veren N1-7, H50Y10 ve ticari greft kodlu biyo-greftlerin verdiği görülmektedir. Üretilen bütün biyo-greftler ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, kontrol grubunun defekt boyutunun ve görüntüsünün 60. gün çekilen röntgen görüntüsünde küçülmeye başladığı görülürken ürettiğimiz bütün biyo-greftlerin defekt dolgusunun ve boyutunun 30. gün dolmaya ve küçülmeye başladığı gözlenmiştir. Böylece defekt onarımında kullanılan biyo-greftlerin defekt boşluğunun dolmasını hızlandırdığı görülmüştür. 60. gün çekilen röntgen görüntülerinde bütün biyo-greftlerin kullanıldığı defektlerin küçüldüğü, fakat yine de defekt yerlerinin görüldüğü tespit edilmiştir. Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz N1-7, H60, H30Ca ve H50Y10 biyo-greftlerin de en iyi röntgen görüntüsünü (defekti doldurma ve küçültme yönünden) HA sentez (N1-7 kodlu) biyo-grefti ile %50 HA esaslı ve %10 Yttria katkılı (H50Y10 kodlu) biyo-greftlerden elde edildiği görülmektedir(Şekil 4.130 ve Şekil 4.131). %60 HA esaslı (H60 kodlu) ve %30 HA esaslı ve %10 CaO katkılı (H30Ca kodlu) biyo-greftler de ise defekti en iyi dolduran ve küçülten biyo-greftin H30Ca kodlu biyo-greft olduğu belirlenmiştir.

4.6.1.1. I ve II. Gruptaki (H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 Kodlu) Biyo-Greftlerin Doku Cevabına Yönelik Histopatolojik İncelemeleri

Sol-jel yöntemiyle üretilen HA esaslı greftlerin dişi Yeni Zelanda tavşanlarının sol tibiasına yerleştirilerek yapılan in vivo deneyi sonucu farklı greftlerin kemik defektlerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla ve işlem gören bölgedeki kemik oluşumunun hücresel anlamda ortaya

konması için greftlerin yerleştirildiği kemik bölgesinin histopatolojik açıdan analizleri yapılmıştır. Böylece farklı kimyasal bileşime sahip greftlerin yerleştirildiği bölgedeki kemik defektinin onarımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca greft doldurulmamış kemik defektleri ile ticari grefttin konulduğu kemik defektlerinin iyileşme süresi, üretilen kemik greftleri ile kıyaslanıp aradaki farklılıklar ve benzerlikler gözlemlenmiştir. Üretilen greftlerin etkileri ve kıyaslamaları histopatolojik incelemeler ile daha objektif olarak ortaya konmuştur. Kemik defekti bölgesindeki dokunun mikroskobik olarak değişimi incelendikten sonra yeni doku hücrelerin oluşup oluşmadığı veya delme sonucu oluşan hasar bölgesindeki iyileşmenin ne derece meydana geldiği belirtilmiştir.

Yapılan çalışmada histopatolojik araştırmalar Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuarlarında gerçekleştirilmiştir. Bütün numunelerin histopatolojik incelemeleri öncesi ön işlemler yapılmıştır. Başlangıçta tavşan kemik defektlerine yerleştirilen greft bölgeleri el testeresiyle kesilip bütün kemikten ayrılmıştır, daha sonra neşter ve çekiç kullanılarak kemik greft bölgesi ikiye ayrılacak şekilde enine kesit boyunca ikiye bölünmüştür. Böylece greft bölgesinde herhangi bir zedelenme oluşmadan kemiğin ikiye ayrılması sağlanmıştır. Şekil 4.132'de de bu işlemin şematik görüntüsü verilmektedir.



Şekil 4.132. Histopatolojik incelemeler öncesi yapılan numune ön işlem hazırlığının şematik görüntüsü. (a) Greftler yerleştirilmiş kemik, (b) El testeresiyle numunelerin tibiadan (kesit) ayrılması, (c) Kemiğin neşter ve çekiçle ikiye ayrılması.

Numune Çözündürme İşlemi:

Ön işlem ile küçültülen kemik greft bölgeleri daha sonra dekalsifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bunun için numuneler kimyasal bileşimi verilen nitrik asit çözelti içerisinde 15 gün bekletilerek kemiğin yapısında bulunan kalsiyum ve tuzların çözülerek kemiğin ve kemik greftinin yumuşamasını sağlayıp histopatolojik incelemeye hazır hale getirilmiştir.

Tablo 4.10. Dekalsifikasyon işlemi için hazırlanan kemik biyo-greftleri çözeltisinin %konsantrasyonu.

Çözeltide kullanılan kimyasal bileşik	**Çözeltide kullanılan kimyasal bileşiğin hacimce derişim miktarı (%)**	**Karışım miktarı (mL)**
Nitrik Asit	65	40
Formaldehit	10	20
Distile Su	-	340

Nitrik asit çözeltisiyle yumuşatılan kemik grefti etiketlenip asit çözeltisi içerisine bırakılarak dekalsine (yumuşama) olmaları sağlanmıştır. Dekalsifikasyon sürecinde numuneler 3 gün arayla dekalsine olup olmadığı kontrol edilmiş ve üç günde bir olmak üzere dekalsifikasyon çözeltisi yenilenmiştir. Şekil 4.133'de kemiğin mikroskop ile incelenmesi için gerekli olan ince parçaların kemikten alınmasını sağlayan kesit alan mikroton hassas kesme cihazı verilmektedir. Dekalsifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra makro kesitler alınıp etiketlenerek takibe alınmıştır.

Şekil 4.133. Histopatoloji numunelerinden kesitler alan LEICA marka mikroton cihazı.

Histopatolojik İnceleme İçin Numune Hazırlanması:

Asit dekalsifikasyon sürecinin ardından, dekalsine olan kemik numunelerinden makro kesitler alınıp etiketlenerek patoloji kasetlerine bırakılmıştır. Kasetlenmiş örnekler takip cihazına konulmuştur. Takip cihazında sırasıyla;1 saat formal, 6 saat alkol, 3 saat ksilol, 4 saat parafin sıvılarında bekletilmiştir. Toplam 14 saat sonra numuneler takipten çıkarılmıştır ve daha sonra numuneler parafin bloğa alınmıştır. Parafin bloklar, kesime uygun hale gelmeleri için buzdolabında 2-3 saat bekletilmiştir. Yeterince sertleşen bloklardan mikroton cihazında 4µm kalınlığında kesitler alınarak, lamlar üzerine yerleştirilmiştir. Alınan bu kesitlerin parafinden arındırma (deparafinize) işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemin içeriği şu şekildedir; önce 60ºC'de 15 dak etüvde bekletilmiş ve Ksilolden geçirilmiştir. Bu şekilde örnekler parafinden arındırılmıştır. Ardından 5'er dak sırasıyla %70-80-90'lık alkol serisinde bekletilerek ksilolden arındırılmıştır. Bu işlemden sonra ksilolden arındırılan ve sertleştirilen örnekler, 3-5 dak su altında yıkanarak alkolden arındırılmıştır. Arındırılmış örnek dokular 3-5 dak mavi renkte olan hematoksilen boyası ile boyanmıştır. Bu boya ile hücrelerin çekirdek kısımları boyanmıştır. Hematoksilenden çıkarılan doku örnekleri, asit-alkol karışımına daldırılıp hiç beklemeden su altında 3-5 dak yıkanarak fazla hematoksilen boyasından arındırılmıştır. Hematoksilen boyasından geçirilen örnekler, 15-30 sn eozin boyasında bekletilmiştir. Bu boya ile hücrelerin sitoplazma kısmı kırmızıya boyanmıştır. Ardından boyadan arındırmak için tekrar 3-5 dak su ile yıkanmıştır. Yıkandıktan sonra, 5-10 sn süre ile %70-80-90'lık alkol serisinden geçirilip numuneler tekrar etüve bırakılmıştır. Etüvde 10 dak 60ºC'de bekletilerek örnekler tamamen kurutulan örnekler tekrar ksilole konulmuştur. Bu şekilde dokuların parlaması sağlanmıştır. Ardından dokuların üzerine entellan damlatılarak dokuların iyice parlaması sağlanarak üzerlerine lameller kapatılmıştır. Bu şekilde hem dokuların hava alarak bozulması engellenmiş hemde mikroskopta görüntünün daha sağlıklı olması sağlanmıştır.

Histopatolojik İnceleme:

Mikroskobik incelemeye uygun hale getirilen numuneler, üzerine dijital bir kamera monte edilmiş OLYMPUS marka optik mikroskop cihazında incelenmiştir. Bu incelemeler esnasında özellikle kemik greftinin kemik ile birleştiği bölge X20 ve X40 büyütme ile görüntülerinin fotoğrafları çekilmiş ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Fotoğraflarda, kemik grefti ve kemik arasındaki bölgedeki lakunalar içerisindeki osteositlerin miktarı, boş lakunaların miktarı, ara bölgede oluşan osteoblast ve osteoklast hücre miktarları greftli ve greftsiz kemiklerde ve ticari greft ile üretilen farklı kemik greftleri ile doldurulmuş defektler ile karşılaştırılıp değerlendirilmiştir.

Kemik kendi mikro ve makro yapısını değişken koşullara göre yenileyebilen ve yeniden modelleyebilen, insan vücudundaki tek dokudur. Bu durum ise osteojenik (kemik oluşturan) ve

osteoklastik (kemik yıkan) proseslerinin hassas dengesi ile korunmaktadır. Kemik dokusunda dört hücre tipi görülmektedir. Bunlar osteoblast, osteoprogenitör, osteosit ve osteoklast hücreleridir.

Osteoblastlar, yeni kemik üreten farklılaşmış bağ dokusu (mezenkimal) hücreleridir [240]. Osteoblastların farklılaşması üç aşamada gerçekleşmektedir; üreme, matris olgunlaşması ve mineralizasyonu. Kolajen tip I, ekstrasellüler matris molekülü (osteopontin), osteokalsin (kemik yapıda olan fakat kolajen olmayan bir protein) ve alkalin fosfataz (bütün vücut dokularında bulunan ve özellikle hücre membranlarında olan bir enzim) aktivitesi osteoblastik fenotipin göstergesidir [241]. Osteoblastlar kuvvetli alkalin fosfataz ile reaksiyon verdikleri için organizmada kemik yapım hızının ölçülmesi istendiğinde kandaki alkalin fosfataz enzim seviyesine bakmak yeterlidir.

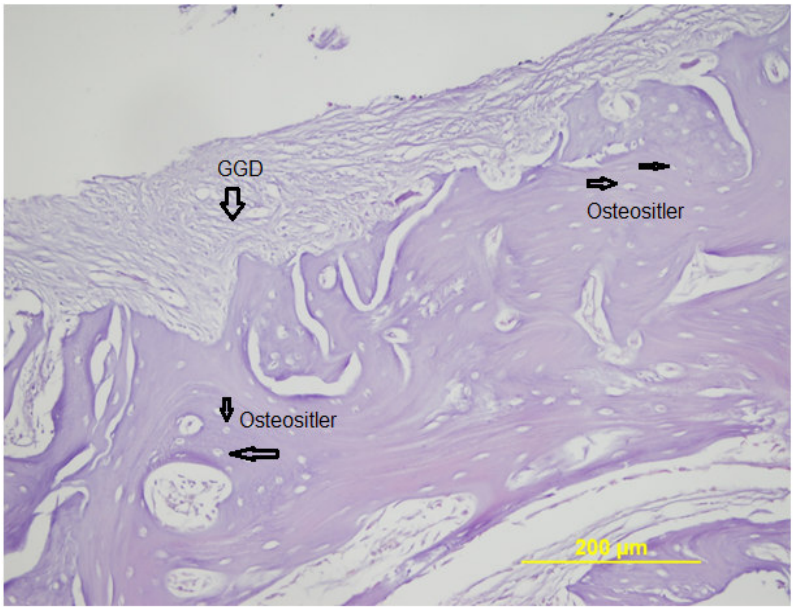
Osteoprogenitör hücreler, kemiğin ana hücreleri olup mezenkimalden kaynaklanırlar. Osteoprogenitör hücreleri mitozla olgun kemik hücrelerine farklılaşırlar. Bu hücreler kemik büyümesinde, zedelenmesi veya kırık tamirinde aktif hale gelerek bölünürler ve osteoblast hücrelerine dönüşürler.

Osteoklastlar, kemikte yıkımı ya da kemik rezorbsiyonunu gerçekleştiren hücrelerdir. Osteoklastlar kemiği asit ile demineralize ederler ve içerdikleri kolajenaz enzimi ile kolajen yıkımı yaparlar [240].

Osteositler, osteoblast ve osteoklastlardan farklı olarak kemik matriste yer alan olgun kemik hücreleridir[242]. Osteoblastların farklılaşmasıyla oluşan bu hücreler lakünada bulunurlar ve çevresindeki komşu osteositlerle kanalikuli yoluyla temasa geçerler [240]. Kemik matriste yer alan tek hücre tipi osteositler olduğu için olası bir kemik matris hasarında ilk etkilenen hücreler de yine osteositler olmaktadır. Böyle bir durum osteositlerin kemik matrise tutunmasını engelleyebilir, birbirleriyle kanalikülerdeki iletişimleri etkilenebilir. Osteositler olgun hücreler oldukları için sentez yapamazlar. Osteositlerin kalsiyumun kemiklerden kana verilmesinde ve hameostatik mekanizmayı düzenleme (kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyerek) gibi önemli metabolik rolleri vardır. Kemik, kendini yeni bir mekanik ortama ostejenesis ve osteoklasis arasındaki eşitliği artı veya eksi yönde bozarak adapte edebilir. Bu proses, kemiğe uygulanan statik ve dinamik yüklerin fizyolojik olarak fazla gelmesi durumunda eşitliği osteojenik aktivite yönünde arttırarak tepki verir. Bu durumun tersinde ise düşük yük durumunda osteoklast mekanizması aktif duruma gelecektir. Bu durum literatürde Wolff kuralı olarak adlandırılmaktadır [243].

Kemik dokusunda içten ya da dıştan gelen zorlamalar nedeniyle oluşan ayrılmaya, başka bir deyimle kemiğin anatomisindeki bütünlüğün bozulmasına *kırık* denir [56]. Kemik kırıklarının onarım süreci birçok bakımdan embriyonik kemik oluşumuna benzer ve üç aşamadan oluşur;

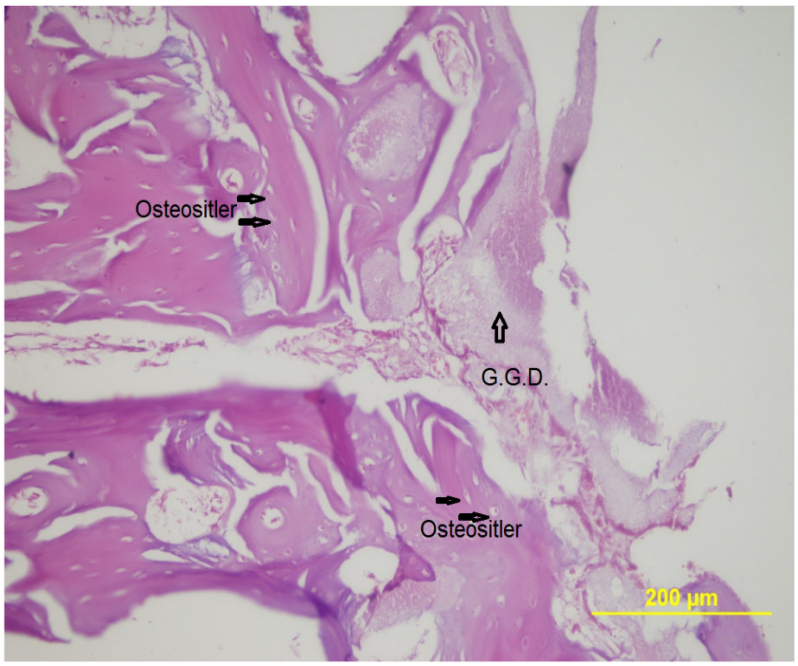
enflamasyon, onarım ve yeniden modellenme [244]. Kırıklar genellikle ilk olarak kanın pıhtılaşmasına neden olur. Pıhtı telleri fagositik hücrelere kimyasal uyarıcılar yollar ki bu vesileyle hasar görmüş bölgedeki hücresel kalıntılar ortamdan uzaklaştırılır. Enflamasyon aşaması en kısa aşamadır ve yaklaşık olarak 72 saat sürer [245]. Enflamasyon aşamasının ardından onarım süreci başlar ki zaman bakımından iki günden iki haftaya kadar sürebilir. Onarılmış dokunun gelişimi kırık pıhtısının düzenlenmesini içerir. Kemik sınırlarında fibroblast ve kondroblastlar görülür ve kıkırdak (kolajen tip II) oluşumu gözlemlenir[245]. Ardından pıhtı geçici kemik olan *callus* ile yer değiştirir. Kemik sınırları arasında köprü oluşturmaya yetecek kadar *callus* oluşunca onarım aşaması biter ve yeniden şekillenme aşaması başlar. Bu aşama uzun sürer ve yedi yıla kadar çıkabilir. Bu aşamada *callus* endokondral kemik oluşum yoluyla örgü kemik ile yer değiştirir. Örgü kemik ağır ağır rezorbe olur ve lameler kemik ile yer değiştirir [245]. Kırık kemiklerin onarım sürecinden yola çıkarak, H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftler sol-jel yöntemiyle üretildikten sonra, in vivo deneylere tabii tutularak histopatolojik incelemeleri yapılmıştır. Bunun için, tavşan kemiklerinin sol tibialarına 3.2mm çapında delik açılmış ve bu deliklere ürettiğimiz biyo-greftler yerleştirilerek 8 haftalık iyileşme sürecinde canlı vücutta tutulmuştur. Daha sonra kemikteki bu greft bölgeleri kesilerek histopatolojik incelemeler yapılmıştır.



Şekil 4.134. Ticari greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu

Matkapla açılan kemik boşluklarına yerleştirilen ticari greftin 2 aylık inceleme sonrası kemik bölgesinden alınan histopatoloji sonucu Şekil 4.134'de verilmektedir. Yapılan histopatolojik değerlendirmelerde ticari greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonucunda hücreden yoğun ve genç granülasyon dokusunun (GGD) varlığı dikkat çekerken, greftin, kemik ya da kıkırdak dokunun mevcut olmadığı görülmektedir. Granülasyon dokusu, kırık bölgesindeki doku eksikliğini

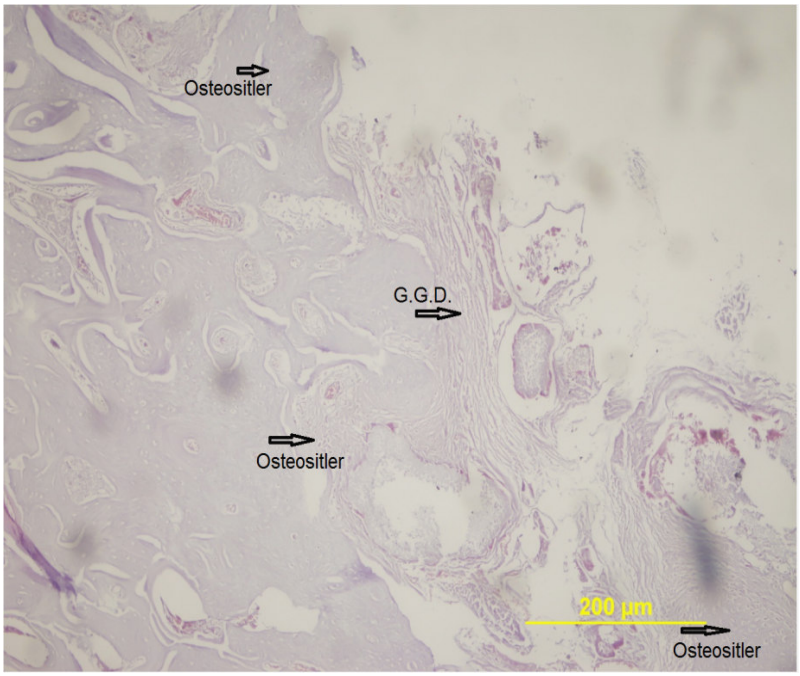
dolduran ve iyileşmeyi sağlayan ve içinde yeni gelişen damar, genç ve aktif bağ dokusu hücreleriyle kan öğeleri bulunan bir dokudur. Ayrıca yapılan patoloji incelemesi sonucu, az miktarda osteositlerin oluştuğu ve yoğun miktarda da boş lakünaların olduğu da gözlenmektedir.



Şekil 4.135. H60 kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu

Biyolojik sistemlerle temas halinde olup, bulunduğu ortamın doğal etkinliğini tedavi etmek, iyileştirmek ya da vücuttaki herhangi bir fonksiyonun ve dokunun yerini almak için farklı bileşenlere sahip biyo-greftler üretilmiştir. Sol-jel yöntemiyle üretilen bu biyo-greftler in vivo deneylerine tabii tutularak kemiğin yerini alıp almadığını, toksit etki göstermeden deforme olan bölgenin iyileşmesini hızlandırıp hızlandırmadığı incelenmiştir.

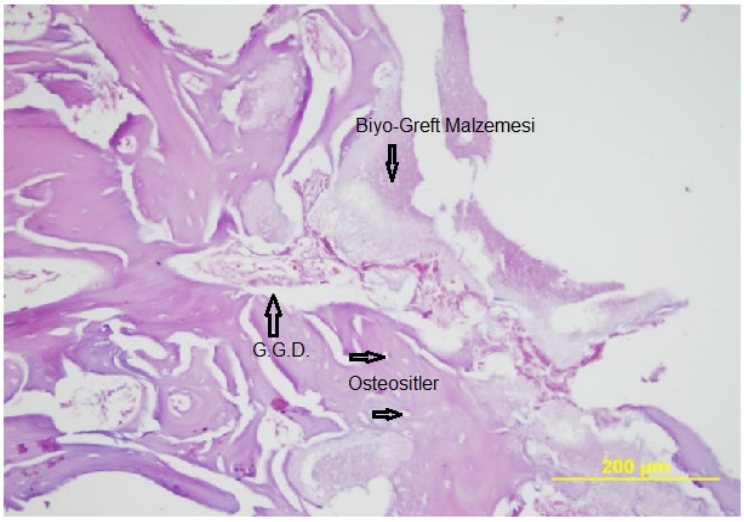
Şekil 4.135 %60 HA esaslı (H60 kodlu) alternatif biyo-greftin hitopatolojik inceleme sonucunu vermektedir. H60 kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan histopatolojik inceleme sonucunda, hücreden yine zengin granülasyon dokusunun (GGD) oluştuğu, kemik dokusunu eritip sindirmenin (rezorbe) olmadığı ve yeni kemik doku formasyonunun da bulunmadığı dikkat çekmektedir(Şekil 4.135). Ayrıca ticari greft yerleştirilmiş örneklerle kıyaslandığında, H60 kodlu greftin yerleştirildiği kemikte daha yoğun osteositlerin oluşması ve lakunaların miktarının daha az olmasına bağlı olarak daha iyi kalitede kemik doku oluşumunun elde edildiğini söylemek mümkündür.



Şekil 4.136. H50Y10 kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu.

İnsan iskeletinin esas gorevi kasların yapışmasına olanak sağlamak ve iç organları koruyarak desteklemektir. Kemiğin biyomekaniği de bu kompleks gorevleri yapabilmesine olanak sağlamasıdır. Kırık, biyomekanik açıdan kemiğin yapısal yetersizliği olarak tanımlanabilir. Yetersizlik, kemiğe uygulanan yuklerin kemiğin yük taşıma kapasitesini aşması sonucu oluşur. Kemiğin yük taşıma kapasitesi; geometrisine (şekil, boyut ve kemik kütlesinin dağılımı), malzeme ozelliklerine (doku özellikleri) ve uygulanan yükün yönü ve büyüklüğüne bağlıdır [246,247].

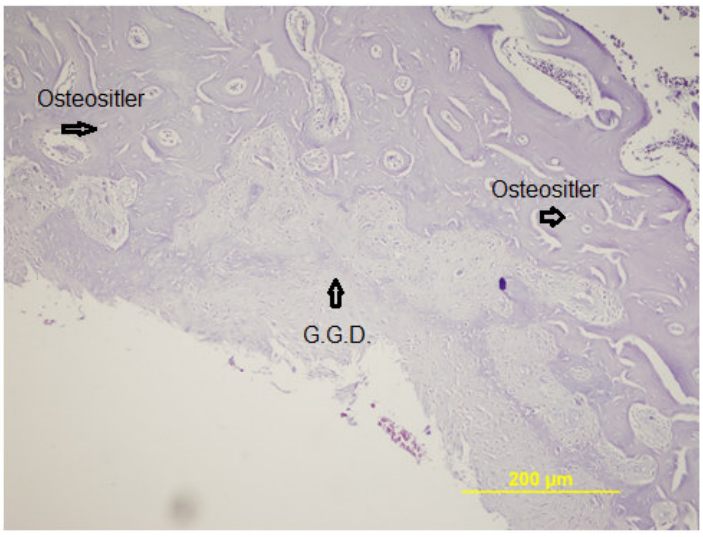
Yapılan çalışmada, ürettilen H50Y10 kodlu alternatif biyo-greft de mekanik özellikleri arttırıp, kullanıldığı bölgede kırılmaya karşı dayanımı arttıracağını düşündüğü yttria tozu ilave edilmiştir. Şekil 4.136 HA esaslı %10 Yttria içerikli biyo-greftin histopatoloji inceleme sonucunu vermektedir. Histopatoloji incelemesi sonucu, kemik korteksinde greft malzemesinin bulunduğu görülürken, kemikte greft malzemesinin tam olarak rezorbe olmadığı, malzemenin çevresinde ince bir halkadan ibaret bir granülasyon dokusunun biçimlendiği dikkati çekmektedir (Şekil4.136). Ayrıca greftin yerleştirildiği bölgede yoğun bir osteosit yapısının oluştuğu da gözlenmektedir.



Şekil 4.137. H30Ca kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu.

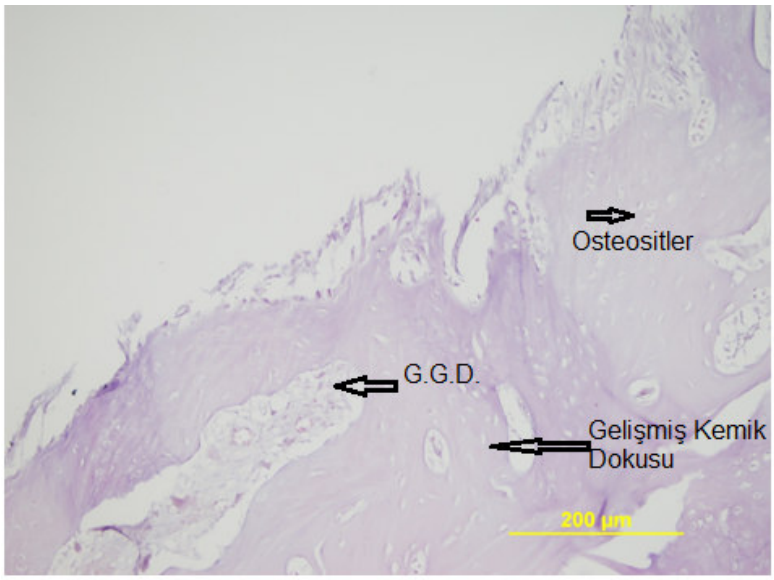
Şekil 4.137 %30 HA esaslı ve %10 CaO katkılı (H30Ca kodlu) alternatif biyo-greftin histopatolojik inceleme sonucunu vermektedir. H30Ca kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan histopatolojik inceleme sonucunda, hücreden genç granülasyon dokusunun (G.G.D.) oluştuğu görülürken, yapıda H30Ca kodlu biyo-greft malzemesinin olduğu ve hasarlı dokuların (lezyonların) bulunduğu dikkat çekmektedir(Şekil 4.137). Ayrıca histopatoloji sonucunun alındığı yüzeyde dağılmış bir şekilde osteositlerin oluşduğu da gözlenmektedir.

Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz H30Ca kodlu biyo-greft ile H60, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftler ve kontrol grubu ile ticari greft karşılaştırıldığında, yüzeyde lezyonların oluştuğu ve biyo-greft kalıntılarının kaldığı H30Ca kodlu biyo-greftte en kötü histopatolojik sonucun elde edildiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.138. N1-7 kodlu greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu.

N1-7 kodlu biyo-greftin histopatolojik inceleme sonucu Şekil 4.138'de verilmektedir. Yapılan patoloji incelemesi sonucu, N1-7 kodlu biyo-greft ticari grefte en yakın patoloji görüntüsünü vermekte olup, kemik korteksinde genç kemik doku ve kıkırdak dokusunun (GGD) oluştuğu ve N1-7 kodlu greftin kısmen granülasyon, kısmen de kemik doku oluşumuna sahip olduğu Şekil 4.138'de görülmektedir. Ayrıca oluşan granülasyon dokusu açısından fakir olduğu gözlenmektedir.

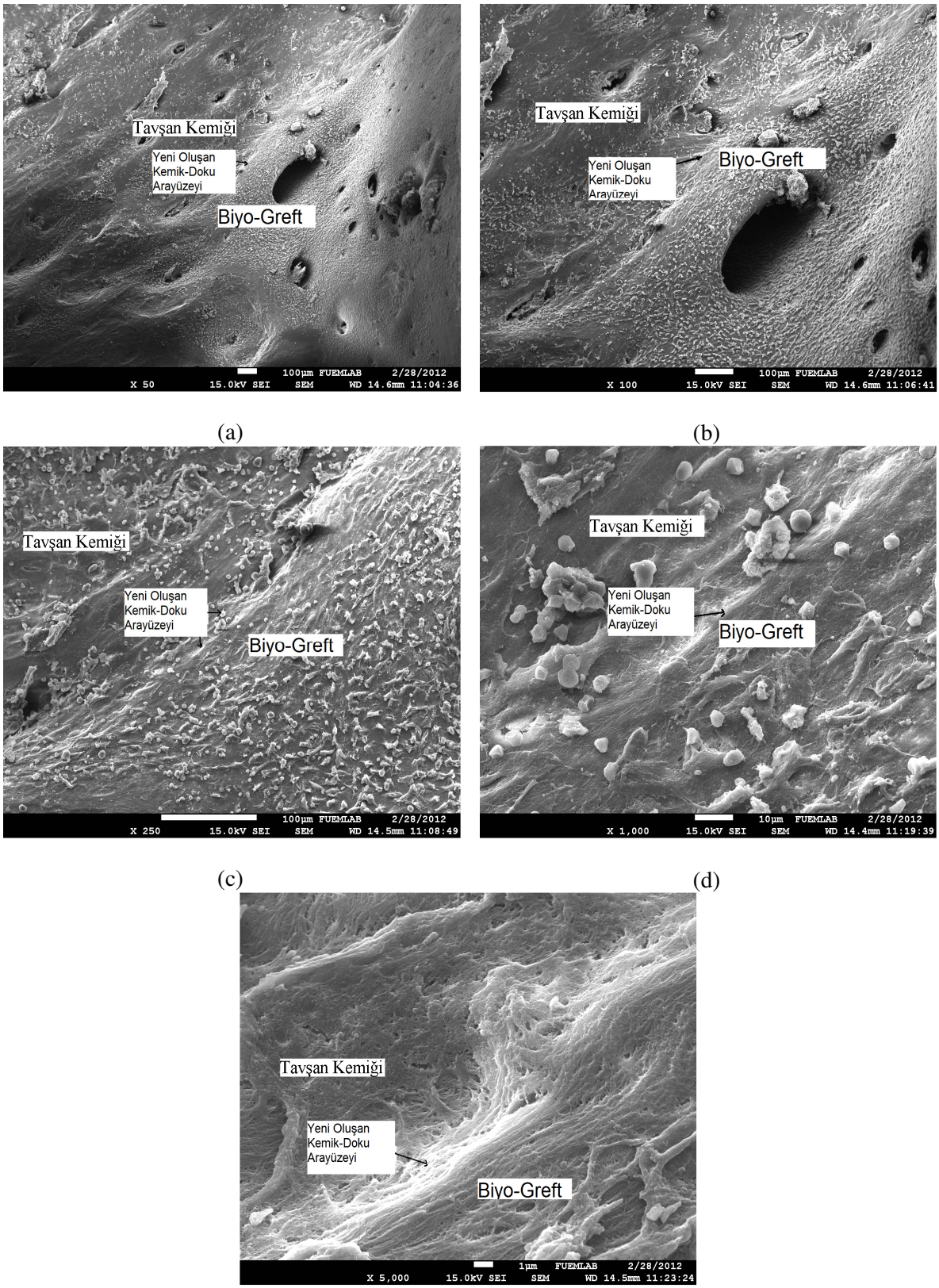


Şekil 4.139. Kontrol grubu kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası alınan histopatolojik inceleme sonucu.

Ürettiğimiz greftleri kıyaslamak amacıyla in vivo deneyine tabii tutulmuş ve ticari greft ile birlikte kemik defektine hiçbir greft yerleştirilmeden oluşturulan kontrol grubu kullanılmıştır. Şekil 4.139'da in vivo deneyi sonrası kontrol grubundan alınan histopatoloji sonucunu vermektedir. Kontrol grubunun patoloji sonucuna göre, yoğun bir şekilde osteositler ve az miktarda da boş lakunaların oluştuğu gözlenmektedir. Ayrıca kemik korteksinde genç kemik doku mevcudiyetinin oluştuğu ve tavşanda tam olarak gelişmiş bir kemik doku varlığına dikkat çekmektedir (Şekil 4.139).

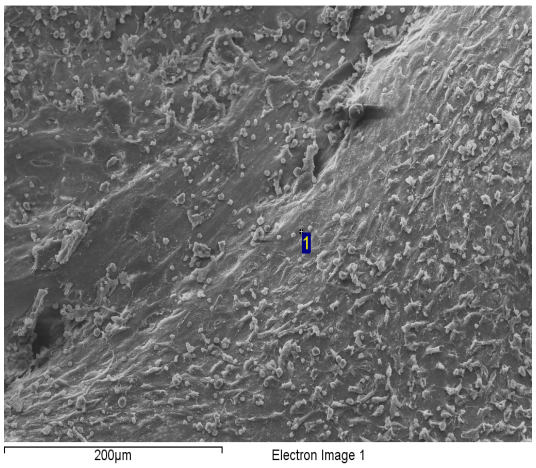
4.6.1.2. Biyo-Greft Bölgelerinde SEM-EDX Analizleri (İn Vivo)

Bu çalışmada amaç, biyo-greftlenmiş bölgelerdeki morfolojik değişimi gözlemlemek ve tespit etmektir. Yeni Zelanda tavşanı kullanılarak yapılan in vivo (drill) deneyleri 60 günlük takip süresi sonrası bitirilmiştir. 60 gün sonra ötenazi yapılan tavşanların sol tibialarının proksimaline yerleştirilen greftlerin bulunduğu defekt bölgeleri kesilerek formaldehit sıvıları içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra SEM-EDX analizlerini yapabilmek için tamamen kurutulması amacıyla, dörder periyotlar halinde 24 saat alkolde bekletilip dört kez 24 saatte 80ºC de etüv fırınında kurutulmuştur. Kurutma sonrası kemiklerdeki nem uzaklaştırılıp SEM-EDX analizleri yapılmıştır.

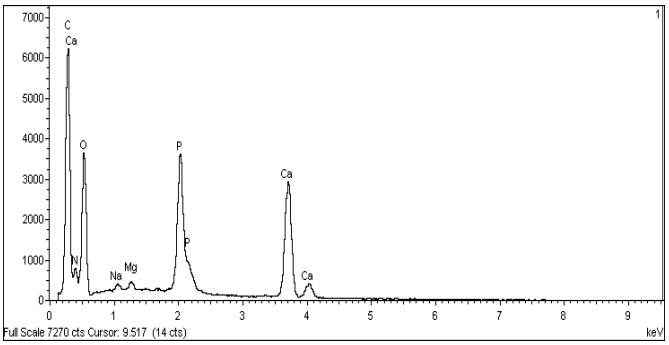


Şekil 4.140. N1-7 kodlu biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a)X50, (b) X100, (c) X250, (d) X1000, (e) X5000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

N1-7 kodlu biyo-greftin in vivo deneyi sonrası greft ve tavşan kemiğinin birleşim yerinden alınan farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.140'de verilmektedir. 60 günlük deney süreci sonunda kemik ve biyo-greftin birleştiği arayüzeyden alınan X50 büyütmedeki SEM görüntüsü tam bir birleşme olduğunu göstermektedir(Şekil 4.140(a)). SEM görüntüsünden tavşan kemiği, greft ve kemik-greft arayüzeyi net olarak görülürken, hem kemikte hemde greft yüzeyinde oluşan poroz görüntü de gözlenmektedir. X100 büyütmede kemik-greft arayüzeyinde tüm greftin çözündüğü ve yeni kemik oluştuğu tespit edilmiştir(Şekil 4.140 (b)). X250 büyütmede kemik-greft arayüzeyinden greft yüzeyinde daha fazla oluşan, fakat kemik yüzeyinde de görülen apatit tanelerini göstermektedir. Kemik-biyo-greft arayüzeyine daha büyük büyütmelerde bakıldığında sınır daha belirgin bir şekilde görülürken, apatit tanelerinin de yoğun bir şekilde arayüzeyde yoğunlaştığı Şekil 4.140 (d-e)'de görülmektedir.



(a)



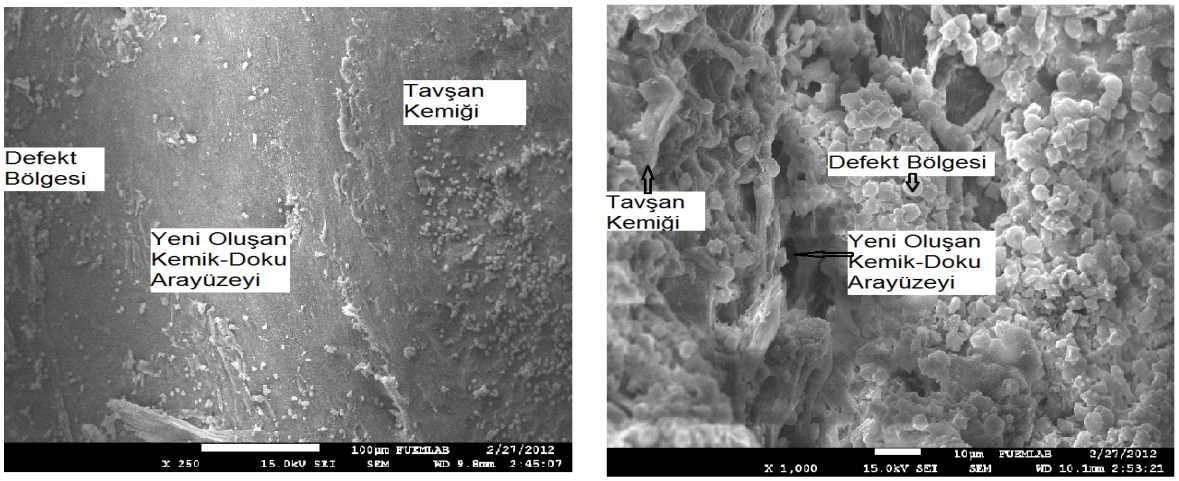
(b)

Element	C	N	O	Na	Mg	P	Ca
% Ağırlık	35.55	14.09	33.31	0.30	0.31	6.14	10.31

(c)

Şekil 4.141. N1-7 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınan (c) EDX spektrumu

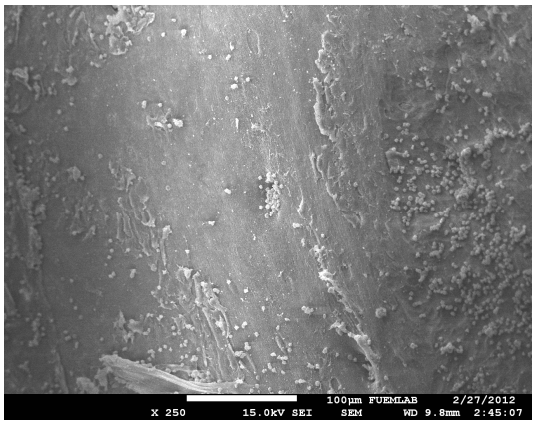
pH değeri 7 olan N1-7 kodlu HA sentez biyo-greftinin yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınan EDX spektrumu Şekil 4.141 (a-c)'de verilmektedir. X250 büyütmede kemik-greft arayüzeyinden alınan SEM görüntüsüne göre yüzeyde apatit tanelerinin oluştuğu gözlenmektedir. EDX noktasal analiz sonuçlarına göre bütün noktalarda Ca, P, Na, Mg, O, N ve C iyonları görülürken yüksek miktarda C, O ve Ca iyonlarının bulunduğu gözlenmektedir (Şekil 4.141).



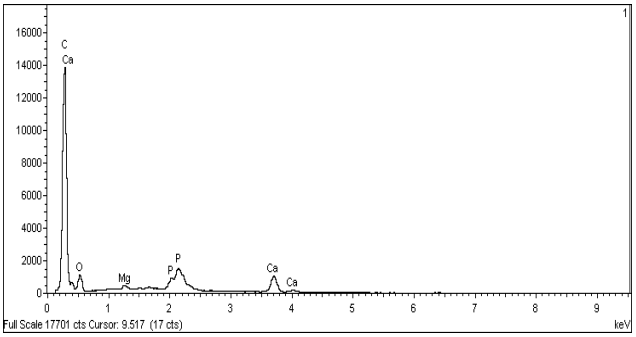
(a) (b)

Şekil 4.142. Kontrol grubunun in vivo deneyi sonrası (a) X250 ve (b) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü

Kontrol grubunun defekt bölgesi-kemik arayüzeyinden farklı büyütmelerde alınan SEM görüntüleri Şekil 4.142 (a-b)'de verilmektedir. X250 büyütmede defekt bölgesi-kemik arayüzeyi net olarak görülmekte olup, yükselti farkından defektin tam kapanmadığı görülmektedir(Şekil 4.142(a)). X1000 büyütmede defekt bölgesi-kemik arayüzeyinde oluşan yeni kemik oluşum bölgesi tespit edilebilmektedir(Şekil 4.142(b)). X1000 büyütmede kemik bölgesinin morfolojik yapısının defekt bölgesindeki morfolojik yapıyla benzer olduğu gözlenmektedir.



(a)



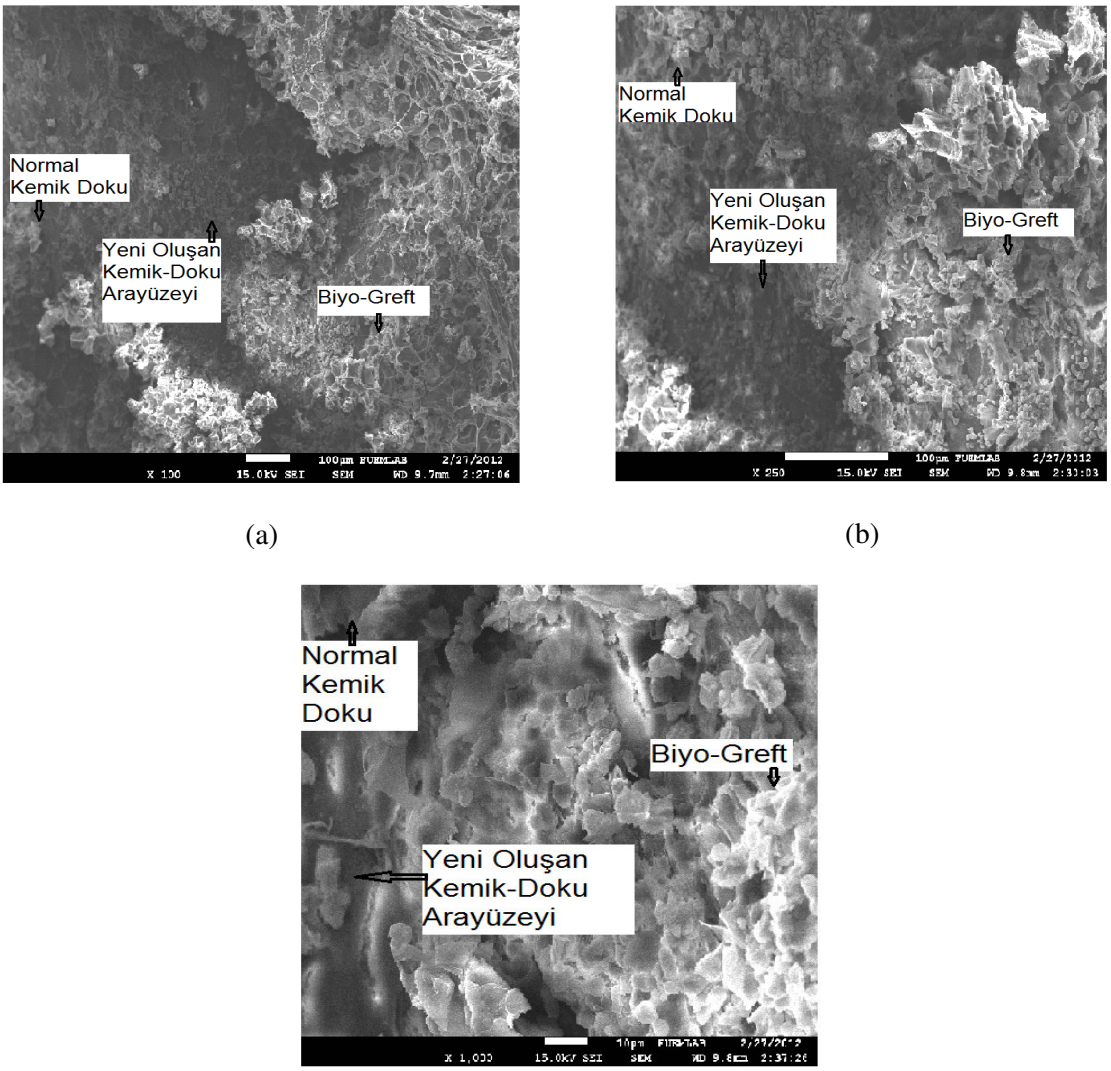
(b)

Element	C	O	Mg	P	Ca
% Ağırlık	74.08	19.06	0.54	0.46	5.86

(c)

Şekil 4.143. Kontrol grubunun in vivo deneyi sonrası farklı bölgelerden alınan EDX spektrumu

Şekil 4.143 (a-c)'de X250 büyütmede kontrol grubunun tavşan tibiasının (proksimal) yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınan EDX analiz spektrumu verilmektedir. X250 büyütmede alınan SEM görüntüsünde tam olarak dolmamış defekt bölgesi görülürken, yeni oluşan kemik-doku arayüzeyi görülmektedir (Şekil 4.143(a)). Yapılan EDX analiz sonucunda Ca, P, C, O ve Mg iyonlarına sahip bileşiklerin oluştuğu ve Ca, C iyon miktarının yüksek olduğu gözlenmiştir.

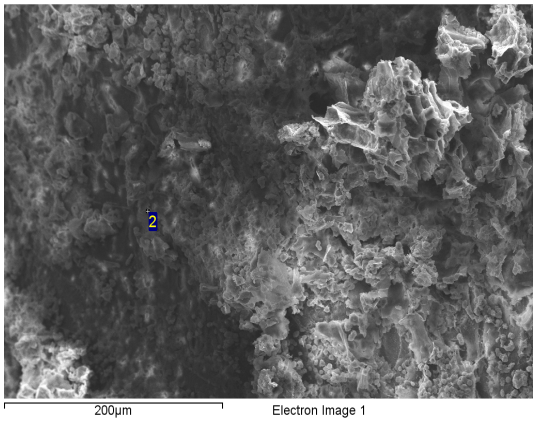


Şekil 4.144. Ticari greft kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a) X150, (b) X250 ve (c) X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüsü

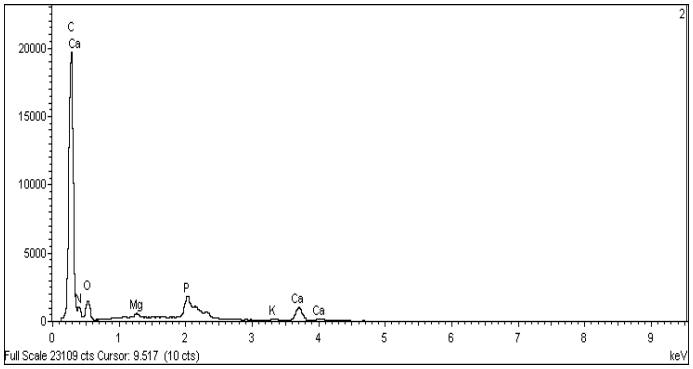
Kemik greftleri ile desteklenen boşlukların ve kemik kesitlerinin membranöz greft malzemeleri ile örtülmesi yoluyla, çevre yumuşak dokularda bölgeye ulaşabilecek epideliyal ve fibroz bağ dokunun kemik iyileşmesine karşı olumsuz etkilerden korunulabilmesi ve böylece osteoblastik aktivitenin ve yeni kemik yapımının daha hızlı ve sağlıklı olarak gerçekleşebilmesi sağlanabilmektedir. Bu membranöz greft malzemerinden bazıları rezorbe olabilirken bir bölümü ise fonksiyon süresince yapısal bütünlüğünü korumaktadır [227].

Şekil 4.144(a-c) bir ticari greftin in vivo deneyi sonrası farklı büyütmelerdeki yapısal SEM görüntüleri verilmektedir. X100 büyütmede tavşan kemiği, kemik-greft arayüzeyi, greft bölgesi net olarak gözlenmektedir(Şekil 4.144(a)). Ayrıca, özellikle ürettiğimiz alternatif biyo-greft yüzeyinde poroz ağ yapısının oluştuğu ve bu yapının tavşan kemiği bölgesine doğru uzandığı görülmektedir. X250 büyütmede kemik-greft arayüzeyi daha net görülürken sınırda oluşan yeni kemik bölgeleri

gözlemlenebilmektedir(Şekil 4.144(b)). X1000 büyütmede greftin yüzeyinde küresel tane yapısı ve kemik-greft arayüzeyinde uzun bir şekilde oluşan çatlaklar tespit edilmiştir.(Şekil 4.144(c)).



(a)



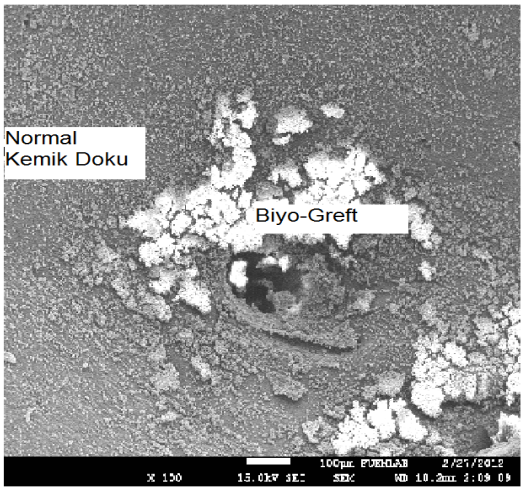
(b)

Element	N	C	O	Mg	P	Ca
% Ağırlık	21.93	58.99	13.88	0.34	1.98	2.73

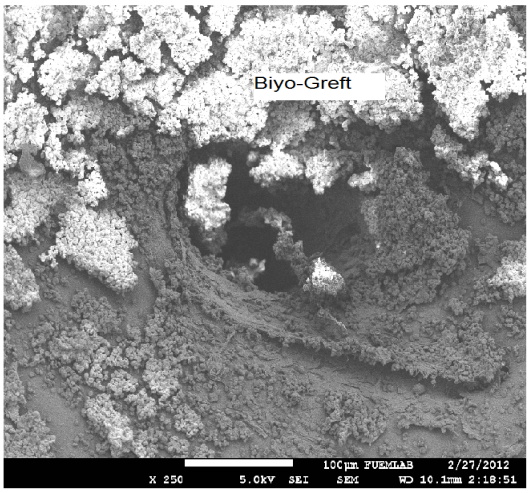
(c)

Şekil 4.145. Ticari greft kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınan EDX spektrumu

Yeni Zelenda tavşanlarının sol tibialarında 3.2mm çapında açılan defektlere yerleştirilen ticari greftin 60 günlük deney süreci sonunda etkilerini incelemek amacıyla ötenazi yapılmıştır. Tavşanlara yapılan ötenazi sonucunda defekt bölgesi kesilmiş ve inceleme için hazır hale getirilmiştir. Şekil 4.145(a-c) ticari greft ile kapatılan defektlerden X250 büyütmede greft ve kemik bölgelerinden alınan EDX analiz spektrumu verilmektedir. EDX analiz sonucuna göre, yapıda Ca, P, O, N, Mg ve C elementlerin bulunduğu görülmektedir. Ayrıca greft bölgesinde P elementi hariç bütün elementlerin %miktarının kemik bölgesindeki miktarlardan daha yüksek olduğu da EDX analizlerinden gözlenmektedir.



(a)

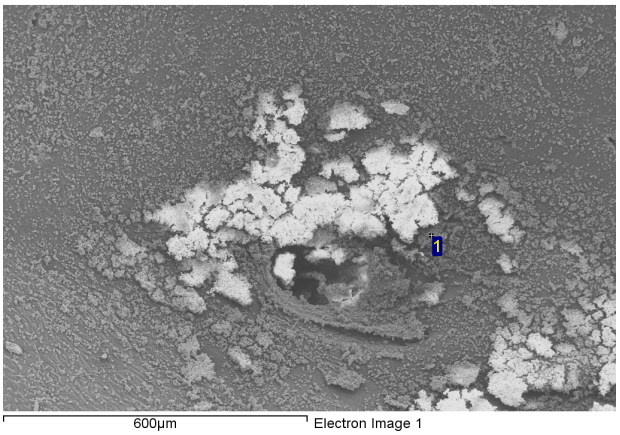


(b)

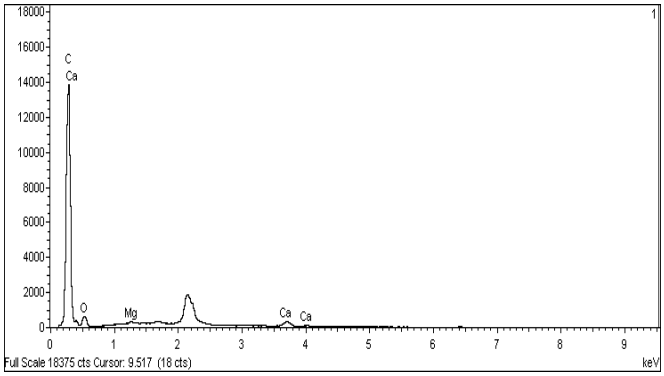
(c)

Şekil 4.146. H60 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a)X150, (b) X250 ve (c) X750 büyütmelerdeki SEM görüntüsü

Şekil 4.146 (a-c) %60 HA esaslı (H60 kodlu) biyo-greftin in vivo deneyi sonrası kemik-greft arayüzeyinden alınan SEM görüntülerini vermektedir. X100 büyütmede kemik, biyo-greft ve defekt bölgesi net olarak görülürken, biyo-greftin defekti tam doldurmadığı görülmektedir(Şekil 4.146(a)). X250 büyütmede defekt bölgesinin katmanlar şeklinde bir yapıya sahip olduğu ve biyo-greftin defekti doldurmak için yeterli miktarda olmadığı gözlenmektedir(Şekil 4.146(b)). Defekt sınırından alınan X750 büyütmedeki görüntüde yüzeyde yoğun bir şekilde görülen küresel tane yapısı net olarak görülmektedir(Şekil 4.146(c)).



(a)



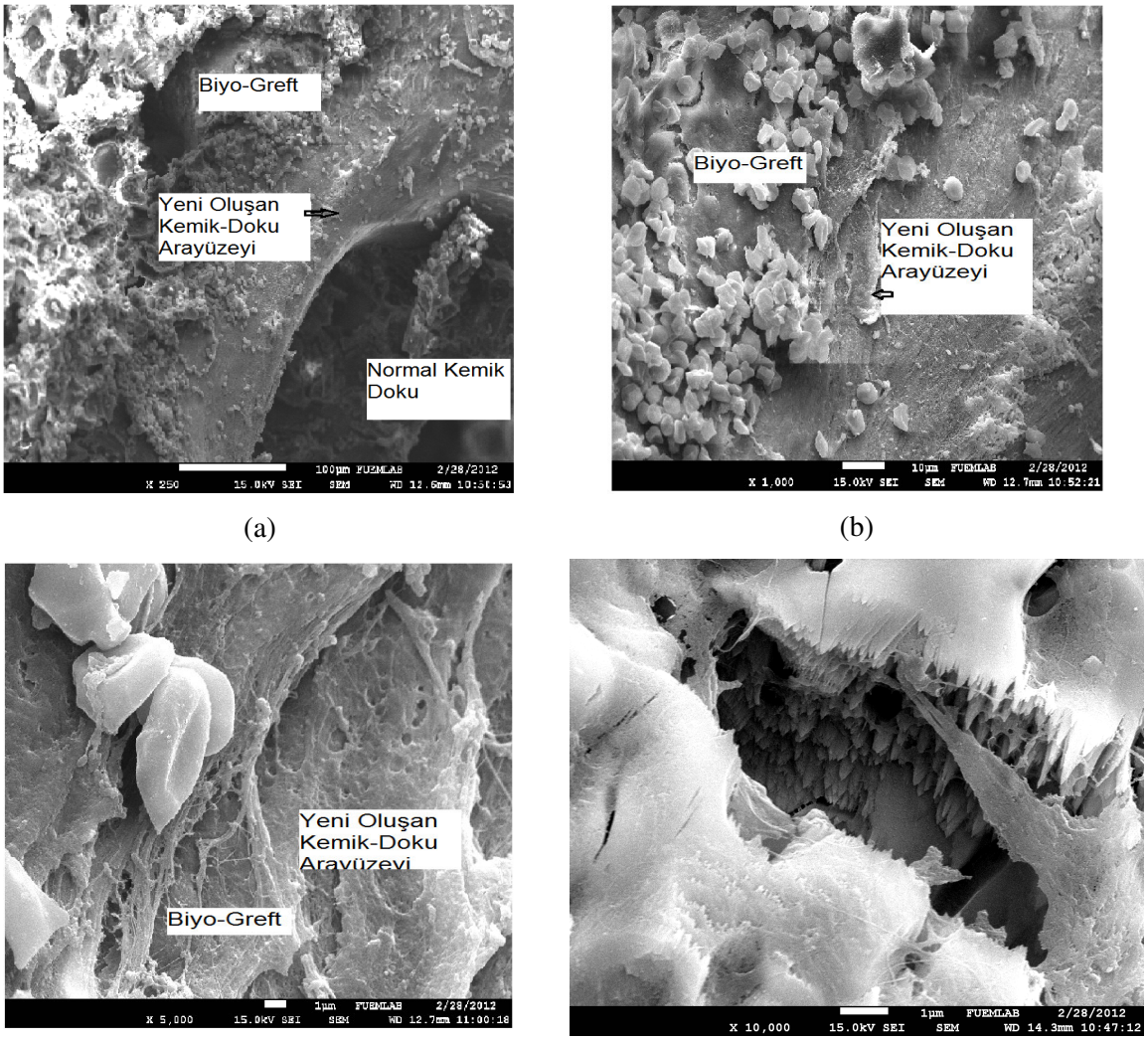
(b)

Element	C	O	Mg	Ca
% Ağırlık	82.83	14.96	0.29	1.92

(c)

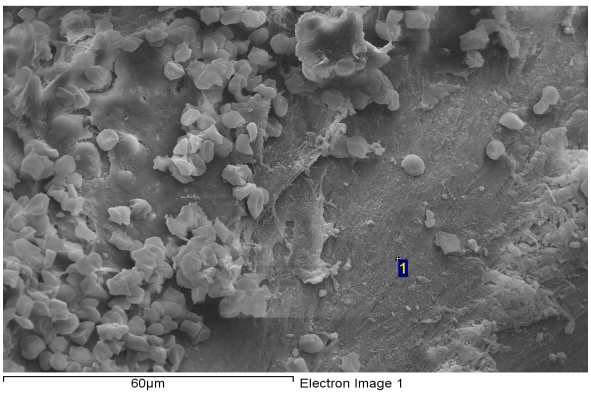
Şekil 4.147. H60 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası greft bölgesinden alınan EDX spektrumu

Şekil 4.147 (a-c)'de H60 kodlu biyo-greftin in vivo deneyi sonrası X100 büyütmede noktasal olarak alınan EDX spektrumu verilmektedir. Defekt bölgesine yakın bölgeden alınan noktasal analiz sonuçları yapıda Ca, O, Mg ve C elementlerinin bulunduğunu göstermektedir. Defekt bölgesine yakın bölgeden alınan EDX analiz sonucuna göre, yüksek miktarda C ve O elementleri görülürken düşük miktardada Mg ve Ca elementlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.147(a)). Bu noktasal analiz, defekt sınırında yeni kemik oluşumunun olmadığını veya eser miktarda olduğunu gösterirken, bu nedenlerden dolayı defekt boşluğunun kapanmadığı gözlemlenmektedir.

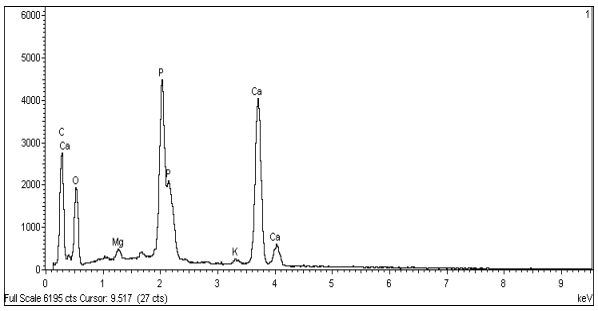


Şekil 4.148. H30Ca kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a)X250, (b) X1000, (c) X5000, (d) X10000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Sol-jel yöntemiyle üretilen HA esaslı alternatif biyo-greft Yeni Zelanda tavşanları kullanılarak 60 günlük in vivo deneyi yapılmıştır. Şekil 4.148 (a-d) farklı büyütmelerde kemik-greft arayüzeyinden ve greft yüzeyinden alınan SEM sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.148 (a) X250 büyütmede kemik-greft arayüzeyinden alınan SEM görüntüsünü vermektedir. SEM görüntüsüne göre kemik-greft birleşim yeri net olarak görülürken, yükselti farkı gözlenmektedir. X1000 büyütmede kemik-greft sınırı daha belirgin iken biyo-greft bölgesinin yüzeyinde oluşan küresel tane yapısıda açıkça gözlenmektedir (Şekil 4.148 (b)). X5000 büyütmede kemik-greft arayüzey sınırındaki yeni kemik oluşumuna bağlı renk değişimi ve biyo-greft yüzeyindeki tane yapısı görülmektedir (Şekil 4.148(c)). Şekil 4.148(d)'de biyo-greftin yüzeyinden X10000 büyütmede alınan SEM görüntüsünü vermektedir. Görüntüye göre gözenekli yapının iç kısmıda kendi içinde özel bir morfolojiye sahip olduğu ve katmanlı bir kemik oluşumunun olduğunu göstermektedir.



(a)



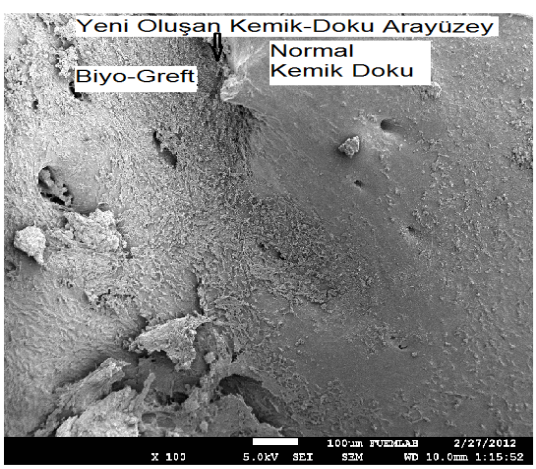
(b)

Element	C	O	P	Mg	K	Ca
% Ağırlık	33.58	31.22	10.94	0.60	0.53	23.14

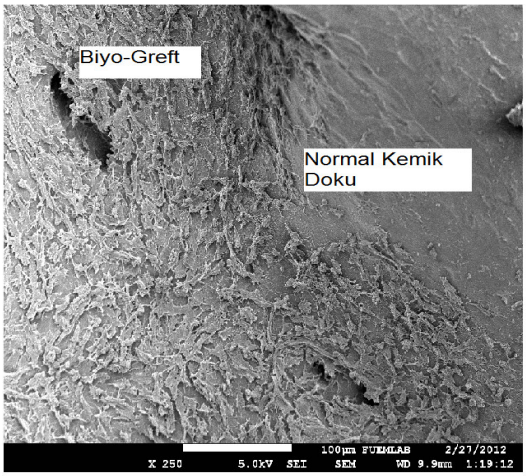
(c)

Şekil 4.149. H30Ca kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınan EDX spektrumu

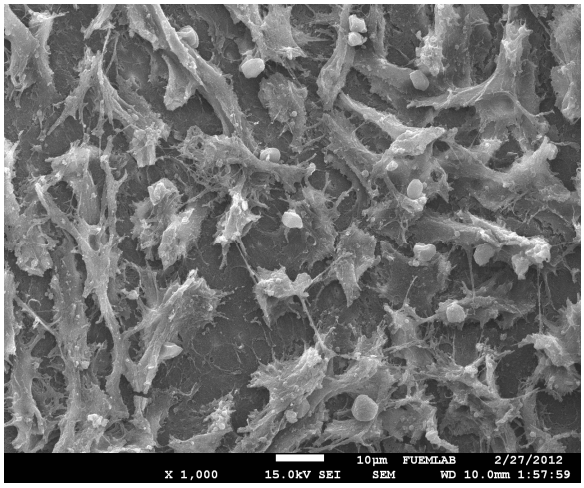
Şekil 4.149 (a-c) H30Ca kodlu alternatif biyo-greftin defekt boşluğuna yerleştirildikten sonra yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinin SEM görüntüsüyle birlikte noktasal olarak alınan EDX analiz sonucunu vermektedir. SEM görüntüsünden kemik-greft arayüzeyi net olarak görülürken, EDX sonuçları yapıda Ca, P, O, C, K ve Mg iyonlarına bağlı bileşiklerin olduğunu göstermektedir. Ayrıca EDX analiz sonuçlarına göre, yapıda yüksek miktarda Ca, O, P ve C olduğu gözlenirken, düşük miktardada Na, Mg ve K olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.149(b-c)).



(a)



(b)



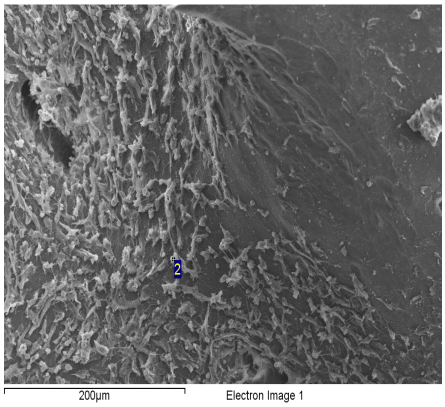
(c)

Şekil 4.150. H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası (a)X100, (b)X250 ve (c)X1000 büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

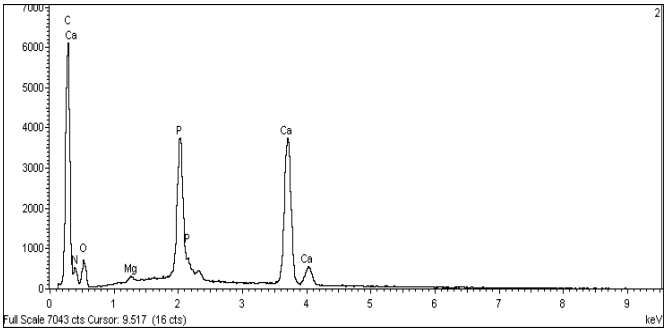
HA'e, Y^{3+} ve F^{-} iyonları eklenmesinin HA'nın yapısal ve mekanik özelliklerinde değişikliklere sebep olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür [228]. Hücre kültürü deneylerinde HA'ya iyon eklenmesinin toksik bir etki göstermediği ve üretilen örneklerin biyouyumlu olduğu görülmüştür. İyon ekleme miktarlarında değişiklikler yapılarak HA'da optimum mikroyapısal, mekanik ve biyolojik özellikler elde edilebileceği gözlenmiştir. Özelliklede en umut verici özellikleri gösteren malzeme HA2.5Y1F olmuştur. Bu malzemede en yüksek sertlik değeri elde edilmiş, yüksek yoğunluk, küçük tanecik boyutu ve düşük çözünme hızı gözlenmiştir. Ayrıca hücre kültürü deneylerinde bu malzemenin biyouyumlu olduğu, hücre yapışması, çoğalması ve başkalaşmasına elverişli bir yüzey sağladığı görülmüştür[228].

Yapılan çalışmada, Yttrianın bu özelliklerinden faydalanmak için HA esaslı yttria katkılı (H50Y10 kodlu) biyo-greftler üretilerek yttrianın biyo-greftin morfolojik ve yapısal özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Şekil 4.150 (a-c) H50Y10 kodlu biyo-greftin in vivo deneyi sonrası

kemik-greft arayüzeyinden alınan SEM görüntülerini vermektedir. Çekilen görüntülerden, diğer üretilen biyo-greftler ile kontrol ve ticari greft grubundan farklı olarak yüzeyde hücrelerin ağ şeklinde çoğaldığını gösteren yapının oluştuğu gözlenmiştir. X100 büyütmede kemik-greft arayüzeyi oluşan ağ görüntüsü sayesinde net olarak görülmektedir(Şekil 4.150(a)). Biyo-greft bölgesinde hücrelerin ağ şeklinde çoğaldığı ve bu şekilde defektin dolduğu görülürken bu yapının kemik yüzeyinde oluşmadığı da gözlenmektedir. X250 büyütmede tane sınırı daha belirgin görülürken hem kemik hemde greft yüzeyinde poroz yapıların olduğu ve bu porozların çaplarının biyo-greft bölümünde daha büyük olduğu tespit edilmektedir(Şekil 4.150(b)). X1000 büyütmede biyo-greft yüzeyinden alınan görüntüde ağ yapısı daha net görülürken, ağlar arasında oluşan tanelerde görülmektedir(Şekil 4.150(c)).



(a)



(b)

Element	C	N	Mg	Ca	P	O
% Ağırlık	44.71	19.71	0.22	16.35	8.24	10.77

(c)

Şekil 4.151. H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınanEDX spektrumu

Şekil 4.151 (a-c) %50 HA esaslı ve %10 Yttria katkılı (H50Y10 kodlu) biyo-greftin in vivo deneyi sonrası yeni oluşan kemik-doku arayüzeyinden alınan SEM görüntüsünü ve noktasal EDX analiz sonuçlarını vermektedir. EDX analiz sonucuna göre, kemik-greft arayüzeyinde Ca, P, O, N, C ve Mg iyonları görülmektedir. Ayrıca Ca, N, C ve O iyon miktarı yüksek görülürken, Mg ve P iyon miktarı da düşük görülmektedir.

4.6.2. I. ve II. Gruptaki (H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu) Biyo-Greftlerin İn Vivo Boşluk Açma Operasyon İşlemleri

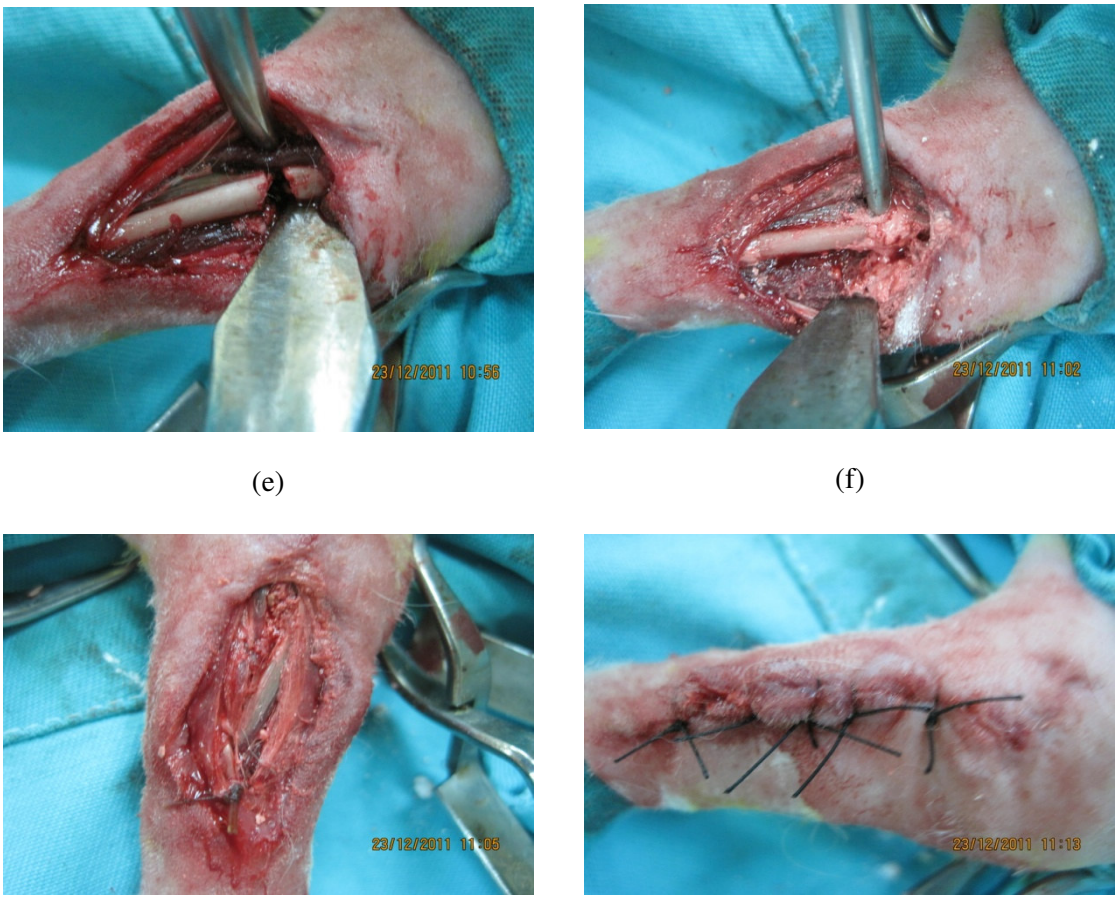
Üretilen biyo-greftler ve ticari greftin (Onspine) kemikte boşluk (GAP) doldurma kabiliyetini test etmek amacıyla Yeni Zelenda tavşanlarının sol tibialarının da in vivo deneyleri yapılmıştır. Medikal sistemlerin güncel kullanımında biyolojik performansını önceden belirlemede, kullanılabilecek ve her geçen gün geliştirilebilecek in vivo ve in vitro testler vardır. Bu testler, kullanılması düşünülen medikal ürünün herhangi bir potansiyel toksisite olasılığını belirlemek için yapılmıştır. Kemiğe implante edilen malzemelerin etkinlik ve güvenilirliklerinin belirlenmesinde in vivo biyouyumluluk çalışmaları çok önemli rol oynamaktadır [1].

(a)

(b)

(c)

(d)



(e) (f)

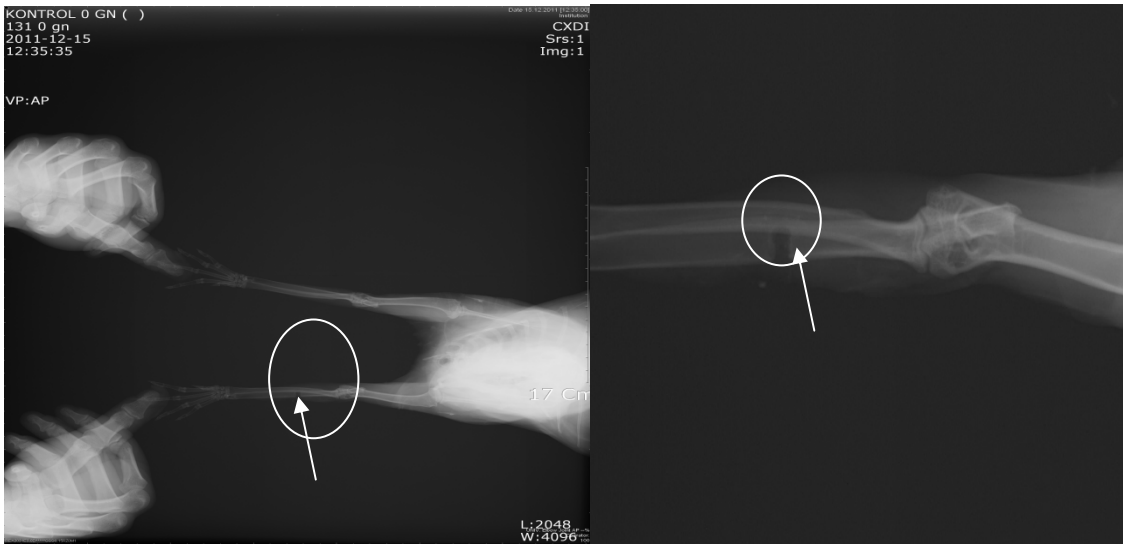
(g) (h)

Şekil 4.152. Ticari greft, H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinin operasyon görüntüleri.

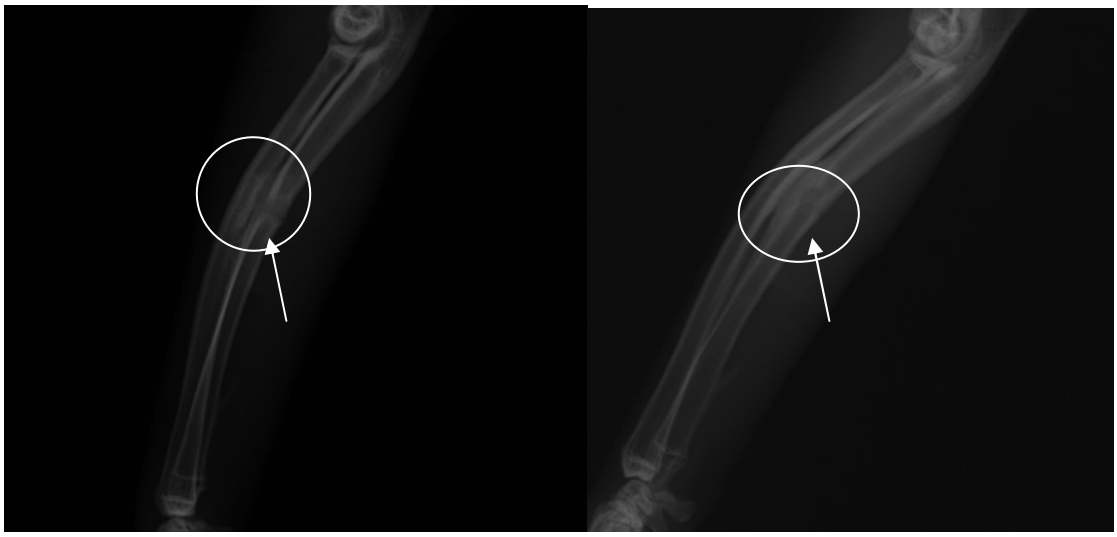
Kemiğe yerleştirilen biyo-greftlerin kemiğin iyileşmesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapılan in vivo deneylerinin operasyon görüntüleri Şekil 4.152 (a-h)'da verilmektedir. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneyinde Yeni Zelenda tavşanlarının tibialarının proksimaline 3.2 mm genişliğinde ve uzunluğunda bir boşluk oluşturulmuştur. Boşluklara yerleştirilen ticari greft, H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin ve hiçbir greft yerleştirilmeden oluşturulan kontrol grubunun operasyon görüntüleri Şekil 4.152'de verilmiştir.

Kemikteki kırık ve defektler dıştan veya içten etki eden kuvvetlerle kemik dokusunda oluşan ayrılmaya veya bu sebeplerle kemiğin anatomik bütünlüğünün ve devamlılığının bozulmasına neden olmaktadır. Kırılmaya etki eden kuvvetlerin derecesine ve kemiğin şoku abzorbe edebilme yeteneğine göre ufak bir çatlaktan (Fissür), bir veya birçok kemiğin kırılmasına; hatta komşu eklemlerde defekt eşlik etmesine (Kırıklı-çıkık) kadar değişiklik gösterebilir. Kırığı oluşturan kuvvet sadece kemiği kırmayıp, beraberinde kemiğin etrafındaki deri, kaslar, tendonlar, ligamentler, damarlar, sinirler ve komşuluğundaki organları da yaralayabilir[17]. Kırık iyileşmesi

kırık olduğu andan itibaren başlar ve inflamatuvar dönem, tamir dönemi, remodelizasyon dönemi olmak üzere 3 aşamadan oluşur. Bu üç dönem biri bitmeden hemen diğerinin başlamasıyla devam ederek en uzun süren dönem remodelizasyon dönemidir. *İnflamatuvar dönemde* kırık uçlar arasında hematom oluşur ve hematom periost tarafından veya periost yırtılmışsa sağlam yumuşak dokular tarafından çepeçevre kolluk şeklinde sarılır. Bu dönem ilk 3-4 günlük süreyi kapsar. İnflamatuvar hücreler nekrotik dokuları rezorbe ederken fibroblastlar bölgeye gelerek *Tamir dönemini* başlatırlar. Tamir döneminde özetleyecek olursak hematom içine yayılan makrofajlar ve osteoklastlar ölü kemiğin ortadan kaldırılmasını sağlar ve osteoblastlar kemik oluşumunu sağlar. Bundan sonra 1-2 sene içerisinde yeniden şekillenme *Remodelizasyon* olur, kırık çevresi fazla kemik dokusu rezorbe olur, medüller kanallar açılır ve normal kemik yapısı kazanılır. Konvansiyonel radyolojinin önemi ve tanı koymada değeri çok fazladır. Kırık derecesi, sayısı, uçların durumu, kırığın yeri, çıkık ve yabancı cisim bulunuşu, kırığa uygulanan redüksiyon ve stabilizasyonun başarısı ve takipte kaynayıp, kaynamadığı ancak iyi bir radyolojik inceleme ile anlaşılabilir[229]. Bu amaçlar doğrultusunda tavşan kemiklerine yerleştirilen ticari greft, H60, H30Ca, H50Y10 ve N1 grubu ile kontrol grubunun operasyon günü, 30. ve 60. Gün (ötenazi günü) çekilen röntgen görüntülerinden greftlerin yerleştirildiği bölge ve iyileşme süreci takip edilmeye çalışılmıştır.



(a)

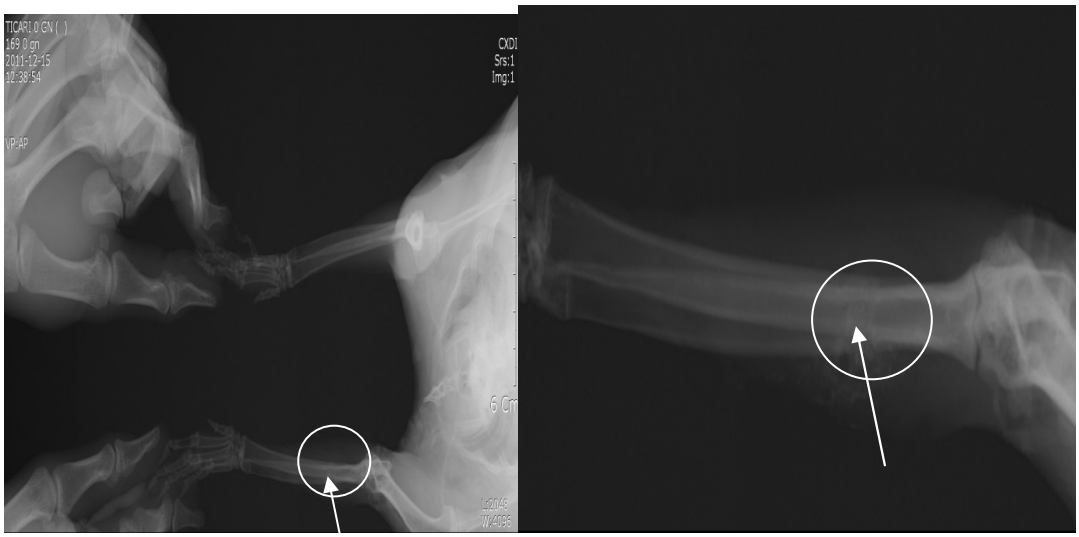


(b) (c)

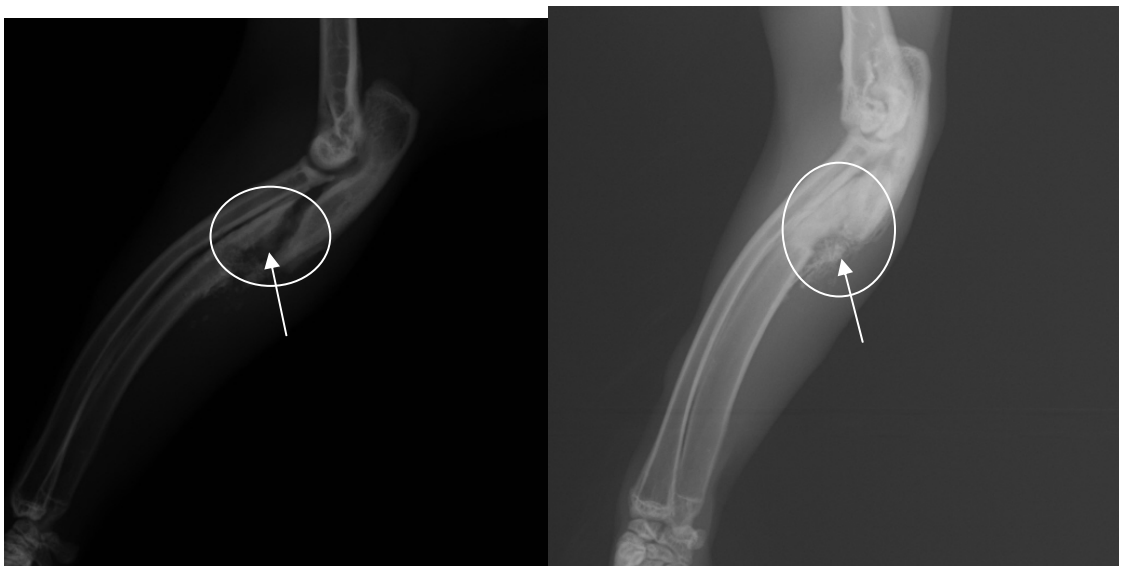
Şekil 4.153. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde kontrol grubunun (a) operasyon günü, (b)30 gün sonra, (c) 60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Şekil 4.153 (a-c)'de tavşan tibialarının proksimalinde açılan boşluğun (GAP), herhangi bir greft doldurmadan öylece bırakılarak oluşturulan kontrol grubunun operasyon günü ile 30 ve 60. günlerdeki röntgen görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.153 (a)'da operasyon günü tavşanların sol bacağından çekilen genel ve yakınlaştırılmış röntgen görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.153 (b)'de 30. gün alınan röntgen görüntüsüne göre, kısmi bir iyileşmenin oluştuğu belirlenmiştir. 60. gün çekilen

röntgende 30. gün görülen etkinin aynısının görüldüğü ve boşluk boyutunun operasyon günündeki boşluk boyutuna göre daha küçük olduğu görülmüştür. Ayrıca gün geçtikçe boşluk boyutunun azaldığı, deforme olan bölgenin operasyon ve 30. gün çekilen görüntüye göre yok olmaya başladığı tespit edilmiştir.



(a)

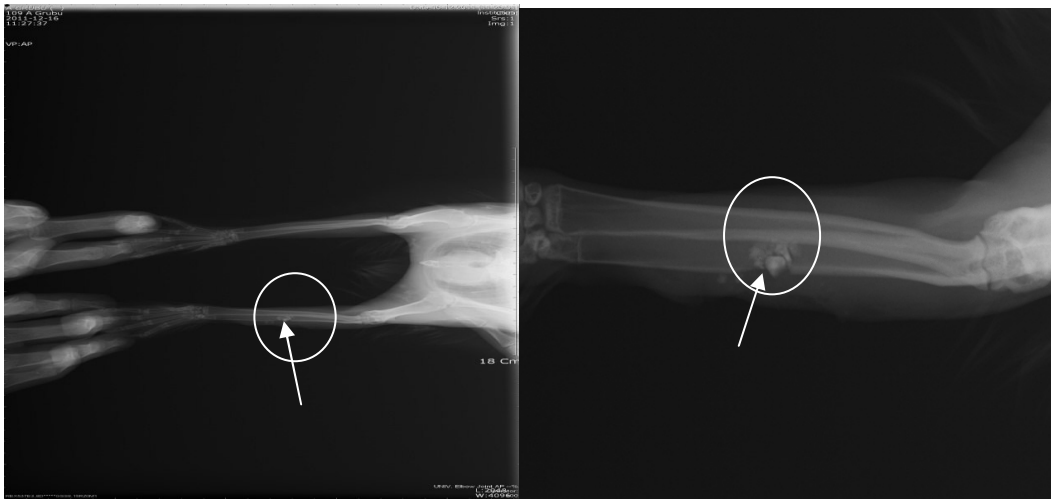


(c)

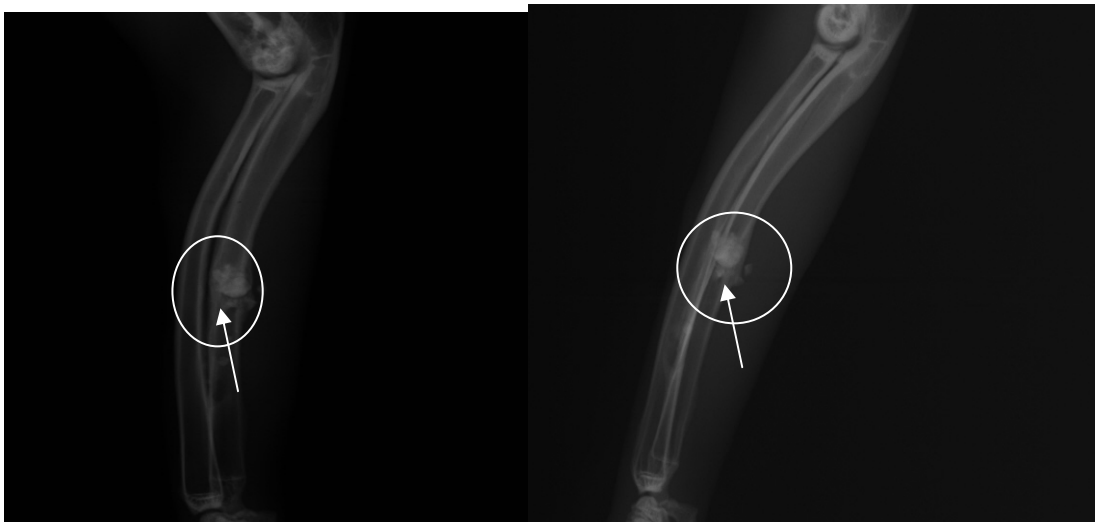
Şekil 4.154. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde ticari greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) ameliyat günü, (b)30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Ticari greftin boşluk yöntemi kullanılarak yapılan in vivo deneyi sırasında çekilen röntgen görüntüleri Şekil 4.154 (a-c)'de verilmektedir. Röntgen görüntülerinden kemikte 3.2mm çapında

açılan defektin operasyon sırasında eklem bölgesine doğru ilerdiği görülmüştür. Defekt bölgesine yerleştirilen ticari greftin operasyon günü tam olarak defekti doldurduğu gözlenirken, 30. gün çekilen röntgen görüntülerinden defektin kapanmadığı, hatta doldurulan greftin defekten ayrıldığı ve buna bağlı olarak boşluğun küçülmeden operasyon günü olduğu gibi kaldığı gözlenmektedir(Şekil 4.154 (b)). 60. gün çekilen röntgen görüntülerinden, defektin büyük bir kısmının kapandığı, fakat defektin ve defekte yerleştirilen greftin net olarak görüldüğü Şekil 4.154 (c)'de tespit edilmektedir.



(a)



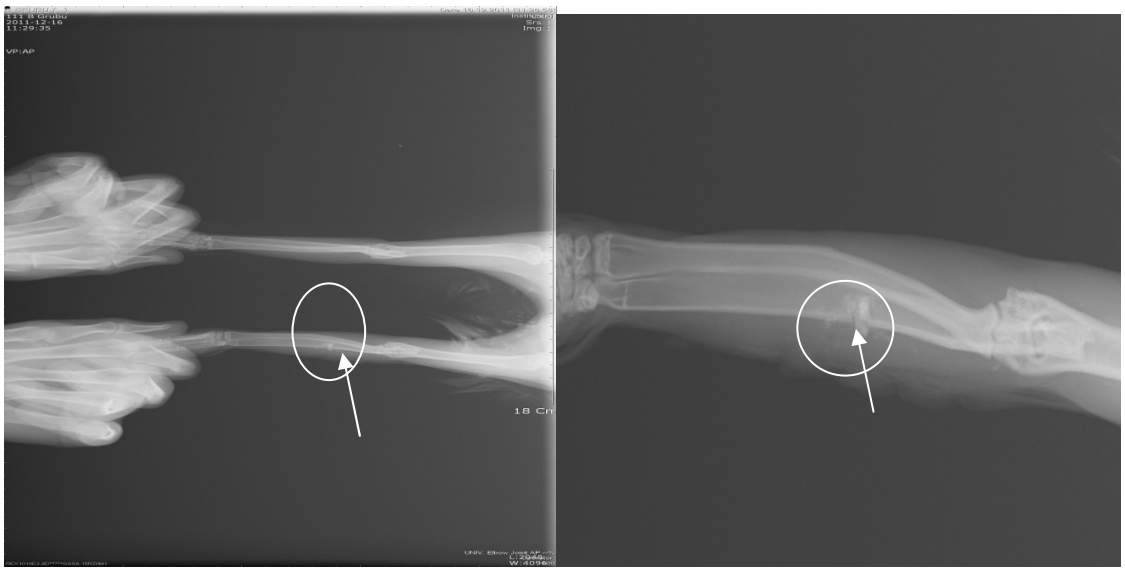
(b) (c)

Şekil 4.155. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde H60 kodlu alternatif biyo-greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

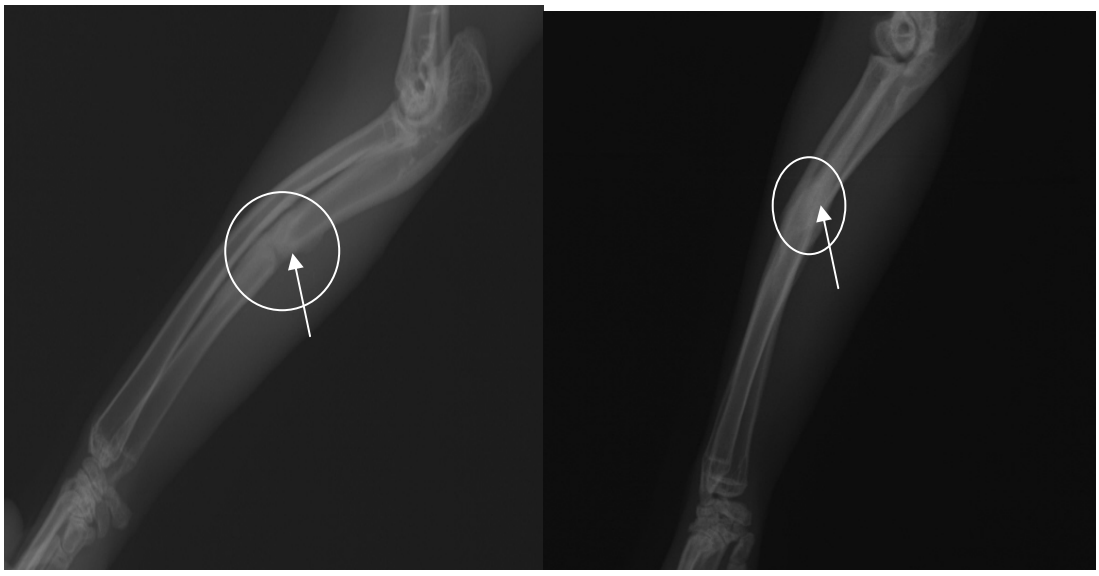
Yeni bir biyomalzeme sentezlerken göz önüne alınması gereken ilk şey, malzemenin biyolojik, tıbbî ve mühendislik özelliklerini uygun bir şekilde birbirleri ile bütünleştirilebilmesidir.

Biyomalzemenin hazırlanma işlemi biyolojik ve yapısal özellikler açısından kompleks bir durumdur. Malzeme Bilimi ve Mühendislik dallarına düşen görev, hazırlanan malzemenin arzu edilen mekanik özelliklerini örneğin; bozunma hızı, şekillendirilme özelliği, yüzey morfolojisi ve porozitesi vb gibi kullanılacak dokunun özelliklerine göre uyarlayabilmektir [246]. Biyoloji ve tıbbî olarak da biyomalzemenin arzu ediliyorsa büyüme faktörü, dokuya tutunmayı kolaylaştıracak hücre tipi taşıması ya da tutunmayı kolaylaştıracak uygun bağlayıcı ajanlar içermesi, bağışıklık sistemi tarafından yabancı madde olarak algılanmaması ve arzu edilen biyoaktifliği gösterip göstermediği incelenip onaylanmalıdır [55].

%60 HA esaslı (H60 kodlu) alternatif biyo-greftin tavşan tibiasına açılan 3.2 mm uzunluğunda ve genişligin de boşluğa yerleştirilmesinden sonra 30 gün ara ile çekilen röntgen görüntüleri Şekil 4.155(a-c)'de verilmektedir. Şekil 4.155(a) H60 kodlu alternatif biyo-greftin operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünü verirken, greftin defekte tam olarak yerleştiği, fakat greft ve kemiğin birleşme bölgesinin seçilebildiği görülmüştür. 30. gün çekilen röntgen görüntüsünde greftin tam olarak defekte yerleştiği, kemik-greft sınırının belirginliğinin azaldığı Şekil 4.155(b)'den tespit edilmiştir. Şekil 4.155(c) tavşanlara yapılan ötenazi günü (60.gün) çekilen röntgen görüntülerini vermekte olup, defektlere yerleştirilen greftlerin defektleri tam doldurdugu, ayrıca yeniden kemik oluşumunu sağlamaya başladığından dolayı defekt boyutunun küçüldüğü belirlenmiştir.



(a)

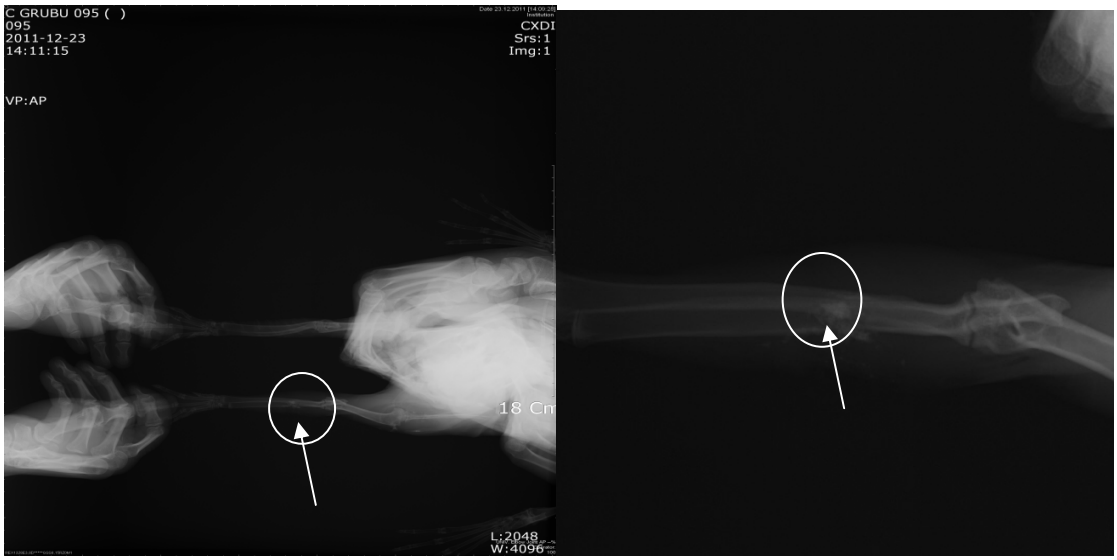


(b) (c)

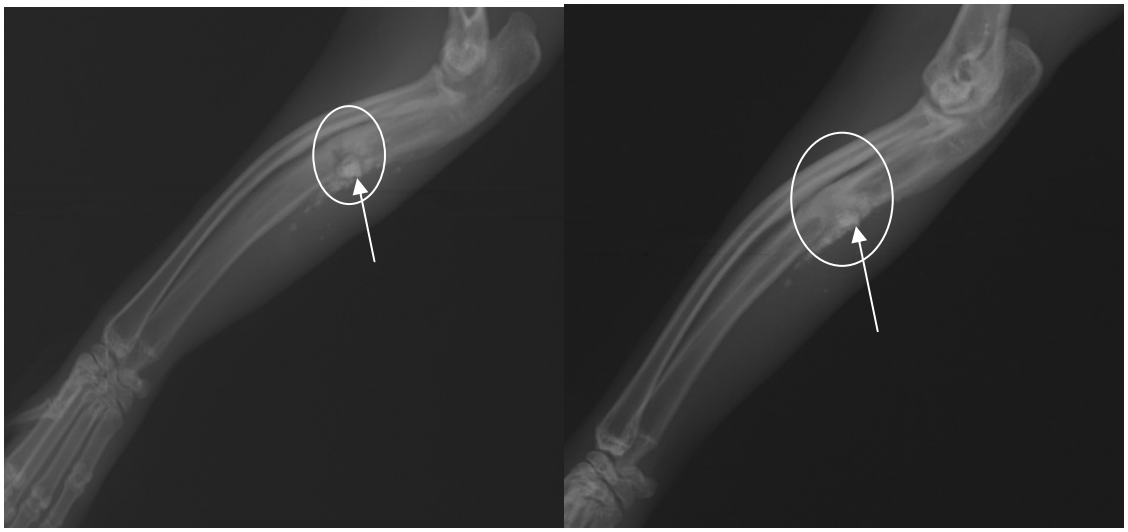
Şekil 4.156. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde H30Ca kodlu alternatif biyo-greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b)30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz %30HA esaslı ve %10 CaO katkılı (H30Ca kodlu) alternatif biyo-greft boşluk yöntemi kullanılarak açılan defektlere yerleştirilmiş ve 2 aylık in vivo deneyi sırasında çekilen röntgen görüntüleriyle defektlerin onarılıp onarılmadığı kontrol edilmiştir.

Şekil 4.156(a-c) H30Ca kodlu alternatif biyo-greftin in vivo deneyleri sırasında alınan röntgen görüntülerini vermektedir. Şekil 4.156(a) operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünü vermekte olup, tavşan tibiasının açılan boşluğun tam olarak greft ile doldurulduğunu göstermektedir. 30. gün çekilen röntgen görüntülerinden defektlerde belirgin bir küçülmenin olduğu görülmüştür(Şekil 4.156(b)). 60. gün çekilen röntgen görüntüsünden H30Ca kodlu greftin en iyi remodeling sonucunu verdiği, defektin görünümünde silikleşmenin çok yüksek olduğu ve defektlerin gözlemlenebilirliğinin çok azaldığı Şekil 4.156(c)'de belirlenmiştir.



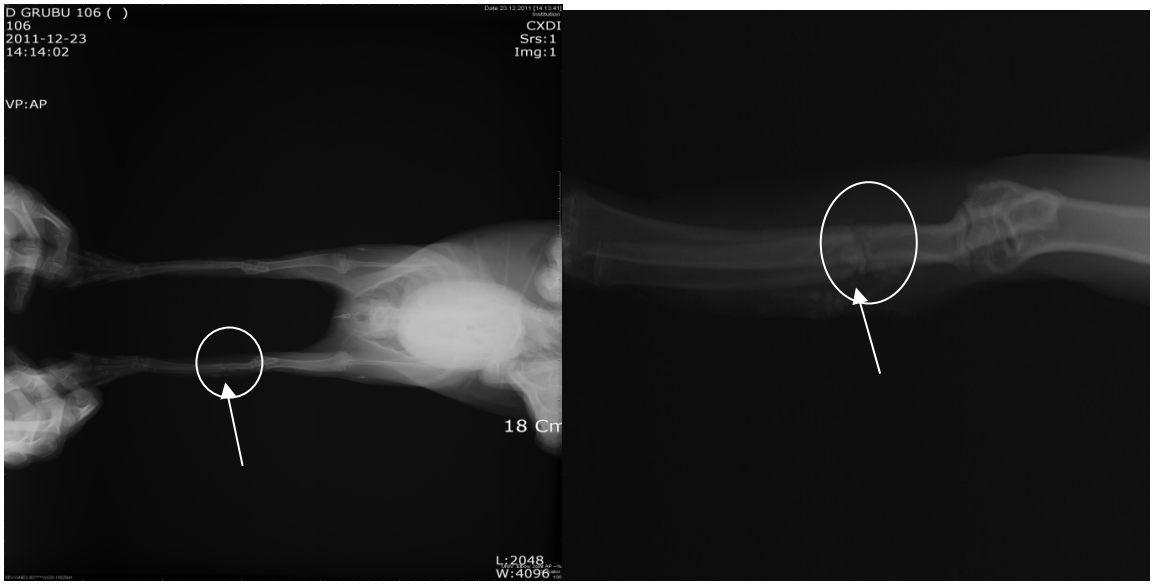
(a)



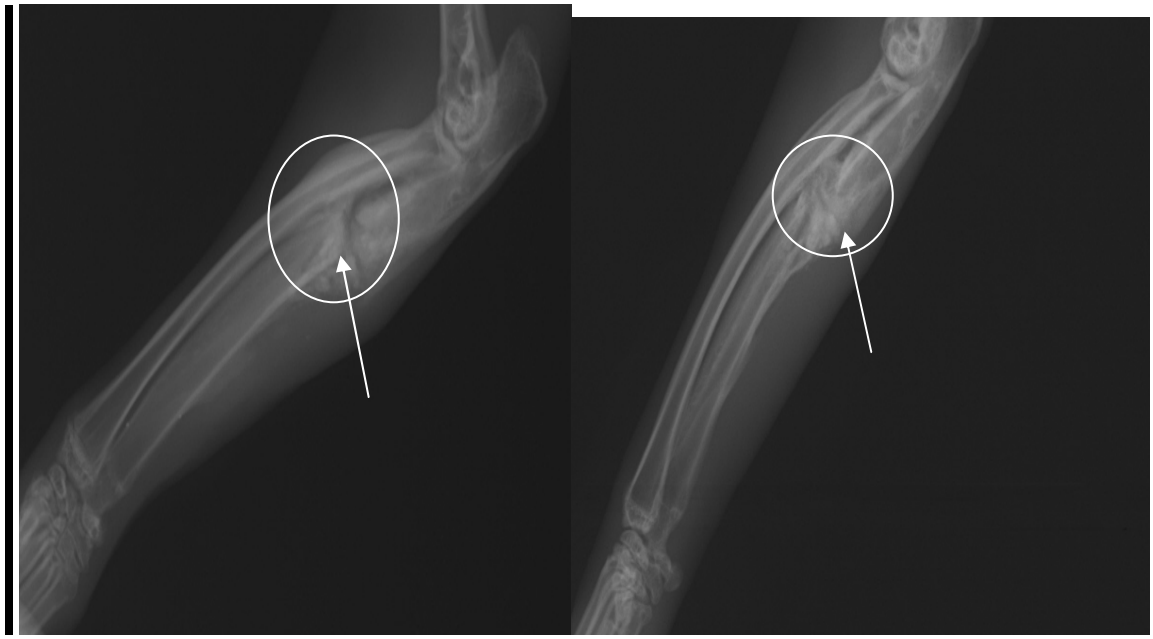
(b) (c)

Şekil 4.157. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde H50Y10 kodlu alternatif biyo-greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c) 60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Yapılan çalışmada, HA esaslı alternatif biyo-greftlere Y_2O_3 gibi bileşikler ilave edilerek üretilen biyo-greftin mekanik özellikleriyle birlikte kemiğin iyileşme süreci azaltılmaya çalışılmıştır. İn vivo deneyi sırasında çekilen röntgen görüntülerine göre, Yt elementinin kemiğin iyileşme sürecini olumlu yönde etkilediği Şekil 4.157(a-c)'de görülmektedir. Şekil 4.157(a) H50Y10 kodlu biyo-greftin operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünü vermektedir. Görüntüye göre operasyon sırasında boşluklar tamamen H50Y10 kodlu greft ile doldurulduğu görülürken, 30. gün defeklerin boyutlarının küçüldüğü net bir şekilde gözlenmektedir(Şekil 4.157(b)). Şekil 4.157(c)'de tavşanlara yapılan ötenazi günü çekilen röntgen görüntüleri verilmektedir. Görüntüde tavşanların sol tibialarında açılan defektlerin, büyük bir kısmının kapandığı ve operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünde görülen büyüklükteki defektin sadece küçük bir kısmının görüldüğü, defekte görülen greftinde silik göründüğü tespit edilmiştir. H60 ve H30Ca kodlu biyo-greftler ve ticari greft ile doldurulan kemik defektleri röntgen görüntüleriyle kıyaslandığında, H30Ca'dan sonra en iyi sonucu veren ikinci greft olduğu da gözlenmektedir.



(a)



(b) (c)

Şekil 4.158. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneylerinde N1-7 kodlu alternatif biyo-greft kullanılarak yapılan operasyonun (a) operasyon günü, (b) 30 gün sonra, (c)60 gün sonunda alınan röntgen görüntüleri.

Bu çalışmada, kalsiyum hidroksit ve fosforik asit kullanılarak HA üretilmiş ve piyasada bulunan ticari HA greftleriyle ve ürettiğimiz HA esaslı alternatif biyo-greftlerle kıyaslanmıştır. N1-7 kodlu HA sentez biyo-grefti tavşanların sol tibialarında oluşturulan 3.2mm uzunluğundaki defektlere yerleştirilerek in vivo deneyi yapılmış ve diğer greftlerle kıyaslanmıştır. In vivo deneyi

sırasında çekilen röntgen görüntüleri Şekil 4.158(a-c)'de verilmektedir. Operasyon günü çekilen röntgen görüntüsünden biyo-greftin defektlere tam doldurulduğu görülmektedir. Ayrıca in vivo deneyinde ticari greft ve N1-7 kodlu greftlerin çekilen röntgen görüntüleri kıyaslandığında, N1-7 kodlu greftin ticari greftin röntgen görüntüsüne yakın görüntü verdiği görülmektedir. Böylece 30. gün defektlerde yeni kemik oluşumunun başladığı, fakat defektlerin net bir şekilde görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.158 (b)). 60. gün çekilen röntgen görüntüsünden, defektin tamamen dolduğu, küçülmeye başladığı, fakat hala görüldüğü belirlenmiştir(Şekil 4.158(c)).

4.6.2.1. Biyo-Greft Bölgelerinde ICP-MS Analizleri (İn Vivo)

ICP-MS oldukça, hızlı ve uygun kütle aralığıyla çözeltide eser element tayini yapan bir kütle spektroskopi cihazıdır. Bir analitik cihaz olarak ICP-MS iki ünitenin bileşimi olarak düşünülebilir, indüktif olarak eşleştirilmiş plazma (ICP) ve kütle spektrometresi (MS). Analizi yapılan örnekteki elementler ICP de iyonlaştırıldıktan sonra kütle spektroskopisine gönderilirler ve burada kütle/ yük (m/W) oranlarına göre ayrılıp ölçülürler.

Düşük tayin sınırı, basit spektra ve izotop oranlarına uygunluk ICP-MS cazip yapan özelliklerdir. Birçok element için gözlenebilme sınırı ng/L'nin altındadır. Multi element tayin yapabilme özelliği sayesinde nitel analizlerde ve izotop oranlarının belirlenmesinde olduğu gibi, başta metalik elementler olmak üzere periyodik tablodaki elementlerin büyük çoğunluğunun çeşitli örneklerdeki nicel ve yarı-nitel tayinlerde de yaygın olarak kullanılmaktadır [259]. Tekniğin önemli özeliğinden birisi de elementlerin kütle spektrumlarının oldukça basit ve elementel özel nitelik taşımasıdır.

Tablo 4.11. İn vivo deneyi öncesi ve sonrası biyo-greftlerin ICP-MS sonuçları (Biyo-greft kodu -.Ö.= İn vivo deneyi öncesi, biyo-greft kodu-S.= İn vivo deneyi sonrası)

Numune Kodu	Ca (ppm)	K (ppm)	P (ppm)	Na (ppm)	Y (ppm)
H30Ca-Ö.	25,6	831,50	17,64	134,6	-
H30Ca-S.	227,7	163,00	1,209	55,27	-
H60-Ö.	16,6	33,73	13,37	126,2	-
H60-S.	51,54	143,20	4,274	170,4	-
H50Y10-Ö.	101,2	34,49	10,7	464,1	0,52
H50Y10-S.	218,5	183,50	34,1	66,9	0,48
N1-7-Ö.	28,73	-	10,62	-	-
N1-7-S.	44,48	711,60	1,209	103,8	-

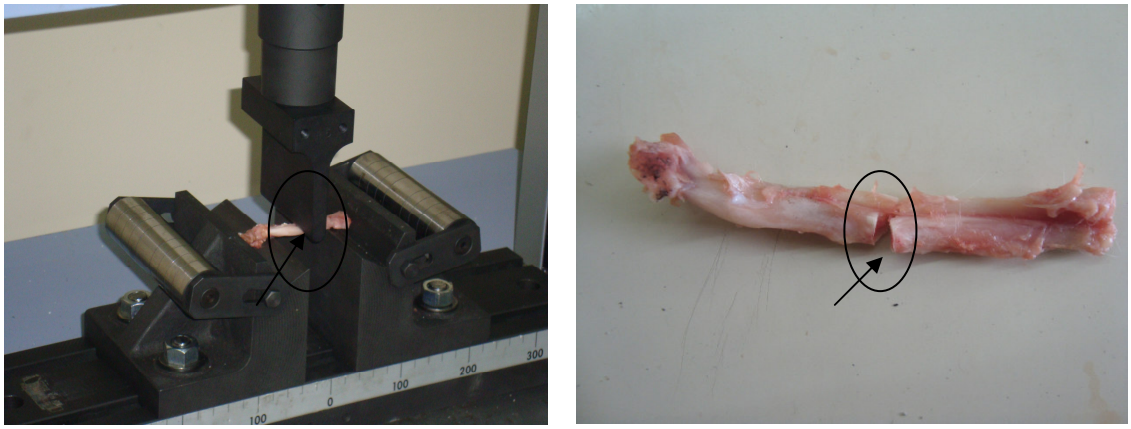
Kemik tibiası üzerinde 3,2 mm çapında delik delerek greft yerleştirdiğimiz in vivo çalışması sonrası biyo-greftlerin kimyasal element miktarında değişiklik olup olmadığını anlamak için ICP-MS analizi yapılmıştır. İlk aşama da, in vivo deneyi öncesi ve sonrası kullanılan biyo-greftler ICP-MS analiz için hazırlanmıştır. Bunun için in vivo deneyinde kullanılan biyo-greftler deney sonrası, kemik yüzeyinden kazınarak alınmıştır. Daha sonra in vivo deneyi öncesi ve sonrası kullanılan biyo-greftler KCl ve Amonyak kullanılarak çözülmüştür. 20 mlt'lik çözeltiler içinde 0,1 ppm miktarında çözünen biyo-greftlerin ICP-MS cihazıyla Tablo 4.11'de verilen element miktarları ölçülmüştür.

Yapılan inceleme sonucu, bütün biyo-greftlerin in vivo deneyi sonrası Ca element miktarında büyük miktarda artış gözlenirken, diğer element miktarlarının (P, K, Na ve Y) değişken olduğu gözlenmektedir. %30 HA esaslı %10 CaO katkılı (H30Ca kodlu) biyo-greftin in vivo deneyi sonrası Ca hariç bütün element miktarlarının (P, K ve Na) düştüğü belirlenmiştir. %60 HA esaslı (H60 kodlu) biyo-greftte ise P elementi miktarının düştüğü, Ca, Na ve K element miktarının arttığı tespit edilmiştir. Yttria bileşiğinin HA esaslı biyo-greftler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla ürettiğimiz, %50 HA esaslı ve %10 Yttria katkılı (H50Y10 kodlu) biyo-greftin in vivo deneyi sonrası Ca, K ve P element miktarının yükseldiği, Na element miktarının yüksek miktarda Yttria element miktarının da düşük miktarda düştüğü gözlenmiştir. Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz pH değeri 7 olan HA sentez (N1-7 kodlu) biyo-greftinin ICP-MS analizinde in vivo deneyi öncesi yapısında sadece Ca ve P elementlerinin olduğu görülürken in vivo deneyi sonrası yapısında K ve Na elementlerinin olduğu da gözlenmiştir. Ayrıca in vivo deneyi sonrası N1-7 kodlu biyo-greftin Ca element miktarının arttığı, P element miktarının düştüğü tespit edilmiştir.

4.6.2.2. Biyomekanik Analizler (Üç Nokta Eğme Testleri)

Bir kemik parçası, canlı iskeletten ayrıldığı zaman mekanik özelliklerinde ve dokularda değişiklikler oluşmaya başlayacaktır. Kanlanması olmayan bir kemik parçasının içindeki hücreler saatler içinde ölmeye başlar [238]. Hücreleri canlı tutmak dokunun ölümünü engelleyecektir, ancak hücreler canlı kalsa da, kemik parçasının mekanik özelliklerin de değişiklikler oluşmaktadır. Dokunun saklandığı şartlar hücreleri canlı tutabilse de içinde bulunduğu ortamın kompozisyonu mineralin dokudan dışarı göçüne neden olabilmekte veya kemiği kesme işlemi bir remodeling (yeniden şekillenme) aktivitesini tetikleyerek kemiğin porozitesini ve mekanik özelliklerini değiştirebilmektedir. Bir kemik parçasının biyomekanik özelliklerini korumak için hücreler ve ekstraselüler (hücre dışı) matriks in vivo (canlı ortamda) da olduğu gibi homeostatik (dengeli) bir durumda bulunması gerekmektedir. Hücrelerin ölümü de kemiğin mekanik özelliklerini değiştirmektedir [238].

Çalışmanın bu bölümünde, Yeni Zelenda tavşanlarının sol tibiasın da boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyinde 3.2 mm uzunluğunda ve genişliğinde kesilen bölgelere ürettiğimiz (N1-7, H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerle doldurularak greftlerin GAP (boşluğu) doldurma kabiliyeti incelenmiştir. 8 haftalık in vivo deneyi sonrası kemikte oluşturulan defektin ve defekte yerleştirilen greftin kemik üzerindeki mekanik etkisini görmek amacıyla üç nokta eğme testi yapılmıştır. Üç-nokta eğme testinde; uygulanan yük altında numunenin altta kalan kısmı çekme gerilmesi, üstte kalan kısmı ise basma gerilmesine maruz kalır. Kuvvetin uygulanması devam ettikçe, tam olarak yükün uygulandığı orta noktada çekme gerilmesi en büyük değerine ulaşır ve sonuç olarak, çekme gerilmesi kritik bir değere ulaştığında numune kırılır[239].



(a) (b)

Şekil 4.159. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneyi sonrası, (a) Uygulanan eğme testi ve (b) Eğme testi sonucu kemikteki kırık bölgesinin görüntüsü**.**

Yeni Zelenda tavşanlarının sol tibialarında boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneylerinde defekt (kırık) bölgeleri ürettiğimiz (N1-7, H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerle doldurulmuştur. İn vivo deneyi sonrası kemiğe 2 mm/dak hızla üç nokta eğme testi uygulanarak, maksimum eğme gerilmesi ve %şekil değistirme değeri hesaplanmıştır.

Boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan üç nokta eğme testi ve eğme testi sonrası kırık bölgesinin görüntüsü Şekil 4.159'da verilmektedir. Görüntülerden testin uygulandığı defekt bölgesi net olarak görülürken, eğme testi sonrası defektin (biyo-greft yerleştirilen bölgede) oluştuğu da görülmektedir.

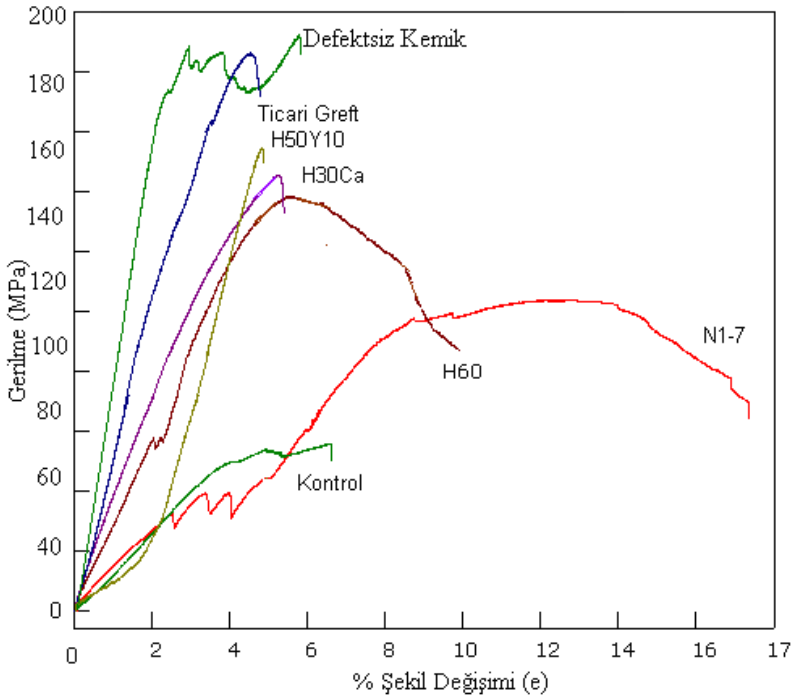
Tablo 4.12. Boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan üç nokta eğme deneyinde Maksimum Gerilme ve %Şekil Değiştirme değerleri

Greft Kodları	Maksimum Gerilme(MPa)	% Şekil Değişimi (e)	Eep (Joule)
H50Y10	149	4,94	0,14
N1-7	103	12,21	0,18
H60	134	5,70	0,32
H30Ca	141	5,38	0,50
Ticari Greft	186	4,83	0,68
Kontrol	54,5	7,24	0,35
Defektsiz Kemik	192	6,07	0,35

Tablo 4.12'de boşluk oluşturularak (GAP) yapılan in vivo deneyleri sonrası kemiklere uygulanan üç nokta eğme testinden elde edilen maksimum gerilme, %şekil değişimi ve elastoplastik enerji (Eep) değerleri verilmektedir. Yapılan inceleme sonucu, gerilme ve %şekil değişimi değerlerinin birbirinin tersi değerler verdiği gözlenmektedir. Böylece boşluklara (GAP'lere) greft yerleştirilerek yapılan üç nokta eğme testin de en yüksek gerilmenin 192 MPa değeriyle defektsiz kemik ve en düşük gerilme değerini de 54,5 MPa değeriyle kontrol grubundan elde edildiği görülmektedir. Maksimum gerilme değerinin tersine en düşük %şekil değişimi (4,83) değerinin ticari greftten ve en yüksek %şekil değişimi değerini de 12,21 değeriyle N1-7 kodlu HA sentez biyo-greftinden elde edildiği tespit edilmiştir.

Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftler arasında en yüksek gerilmeyi 149 MPa değeriyle %50 HA esaslı ve %10 Yttria katkılı (H50Y10 kodlu) biyo-greftin verdiği Tablo 4.12'de görülmektedir. Fakat %60 HA esaslı (H60 kodlu) ve %30 HA esaslı ve %10 CaO katkılı (H30Ca) biyo-greftlerin 134 MPa ve 141 MPa gerilme değerleriyle H50Y10 kodlu biyo-grefte yakın değerler verdiği de gözlenmektedir.

HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerin %şekil değişimi değerleri karşılaştırıldığında, maksimum gerilme değerlerinin tersinin oluştuğu ve gerilme değeri arttıkça %şekil değişimi değerinin düştüğü belirlenmiştir. H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu biyo-greftlerin birbirine yakın %şekil değişimi değerleri verdiği görülürken, en yüksek %şekil değişimini 5,70 değeriyle H60 kodlu biyo-greftten elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca H50Y10 kodlu biyo-greftin en düşük %şekil değişimi (4,94'lük) değerini verdiği Tablo 4.12'de görülmektedir.



Şekil 4.160. Ticari greft, kontrol, H50Y10, H60, H30Ca ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin yerleştirildiği kemiğin in vivo deneyi sonrası üç nokta eğme testi sonucu elde edilen Gerilme-%Şekil Değişimi grafiği.

Eğme gerilmesi veya mukavemeti; bir anlamda çekme ve basma gerilmelerinin malzemeye eş zamanlı etkiledigi andaki mekanik özelligini ifade etmektedir. Silindirik mesnetler arasına serbest olarak yerleştirilen kemiğin, mesnetler arası mesafenin ortasından, mesnetlere ters yönde yüklenmesi sonucu eğme gerilmesi oluşur. Yükün uygulandıgı bölgede basma gerilmesi konsantrasyonu yüksek iken, kemiğin diger kenarındaki bölgelerde ise çekme gerilmesi konsantrasyonunun yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan üç nokta egme prosesin de kemikler, kumpas yardımıyla eşit aralığa ayarlanarak cihaz üzerine yerleştirildi. Yükün uygulanacağı üst çeneye baglı yük motor yardımıyla önce kemik yüzeyine temas ettirildi. Daha sonra baskıyı arttırırken, yük ölçerden yük miktarı takip edildi. Kemik egilmeye başlayıp, kırılıncaya kadar yüklemeye devam edildi ve kemiğin kırılma boyunca gerilme ve uzama değerleri göstergeden okunarak grafik şeklinde kaydedildi.

Ticari greft, kontrol, defektsiz kemik, H50Y10, H60, H30Ca ve N1-7 kodlu biyo-greftler kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası üç nokta eğme testinde Gerilme-%Şekil Değişimi grafiği Şekil 4.160'da verilmektedir. Yapılan incelemeler sonucu, en büyük eğme gerilmesi değerini defektsiz kemiğin verdiği gözlenirken, en düşük eğme gerilme değerini de kontrol grubunun verdiği görülmektedir. Ayrıca grafikte, ürettiğimiz HA esaslı biyo-greftlerden H50Y10 ve H30Ca kodlu biyo-greftler ile dolgulu kemik tam sünek bir egme grafigi vermediği gözlenmektedir. Böylece H50Y10 kodlu biyo-greft ile dolgulu kemik Gerilme-%Şekil Değişimi grafiğinde akma noktası belirli değilken, 149 MPa'lık bir maksimum gerilme ve %4,94'lük bir

%şekil değişimi değeri verdiği net olarak görülmektedir. H30Ca kodlu biyo-greftin Gerilme-%Şekil Değişimi eğrisinde ise, H50Y10 kodlu biyogreft de olduğu gibi akma noktası belirli değilken, 141 MPa'lık bir maksimum gerilme ve %5,38'lük bir %şekil değişimi değeri verdiği net olarak görülmektedir.

pH değeri 7 olan HA sentez (N1-7 kodlu) biyo-greftinin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan üç nokta eğme testi sonucu H50Y10 kodlu biyo-greft ile kıyaslandığında, N1-7 ve H50Y10 kodlu biyo-greftin yerleştirildiği kemiğin Gerilme-%Şekil Değişimi eğrisi birbirine benzer olduğu ve tam sünek bir eğme grafiği vermediği belirlenmiştir. Ayrıca N1-7 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin eğme deneyi sonrası maksimum gerilme değeri (103 MPa) H50Y10 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin maksimum gerilme değerinden (149 MPa) çok daha düşüktür. %Şekil Değişimi değeri ise bunun tam tersi olup, N1-7 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin %Şekil Değişimi değeri (%12,21) H50Y10 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin %Şekil Değişimi değerinden (%4,94) yüksektir. Bu verilere bağlı olarak, HA'e ilave edilen Yttria bileşiğinin HA'in maksimum eğme gerilmesini arttırdığı, fakat %Şekil Değişimi değerini düşürdüğü tespit edilmiştir.

Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA sentez (N1-7 kodlu) biyo-grefti ile ticari greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi sonrası eğme testi sonuçları karşılaştırıldığında, benzer bir Gerilme-%Şekil Değişimi grafiğinin elde edildiği görülürken, Gerilme ve %Şekil Değişimi değerlerinin çok farklı olduğu gözlenmiştir. Böylece ticari greftin kullanıldığı kemiğin gerilme değerinin (186 MPa), N1-7 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin gerilme değerinden (103 MPa) çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. %Şekil Değişimi değerleri kıyaslandığında ise, tam tersi bir sonuç elde edildiği ve ticari greftin kullanıldığı kemiğin %Şekil Değişimi değerinin (%4,83), N1-7 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin %Şekil Değişimi değerinden (%12,21) çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

HA esaslı (H60 kodlu) biyo-greftinin Gerilme-%Şekil Değişimi grafiğine göre, H60 kodlu biyo-greft metallere benzer bir Gerilme- %Şekil Değişimi grafiği verdiği Şekil 4.160'da görülmektedir. Böylece H60 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin eğme testi Gerilme-%Şekil Değişimi grafiği kemiğin sünek bir malzeme olduğunu göstermektedir. H60 kodlu biyo-greftin yerleştirildiği kemiğin eğme testin de 58,8 MPa değerinde akma gerilmesi, 134 MPa değerinde de maksimum gerilme değerini verdiği Tablo 4.12 ve Şekil 4.160'da net olarak görülmektedir. Ayrıca HA esaslı biyo-greftler içerisin de en yüksek %Şekil Değişimi değerini %5,70 değeriyle H60 kodlu biyo-greftin verdiği de tespit edilmiştir.

Üretilen diğer HA esaslı biyo-greftler ile H30Ca kodlu biyogreft kıyaslandığında, H30Ca kodlu biyogreftin maksimum gerilme değerinin H60 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemikten yüksek, H50Y10 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin eğme gerilmesi değerinden de düşük

olduğu belirlenmiştir. %Şekil Değişimi değeri ise tam tersi olup, H30Ca kodlu biyogreftin %Şekil Değişimi değeri H60 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin %Şekil Değişimi değerinden düşük, H50Y10 kodlu biyo-greftin kullanıldığı kemiğin %Şekil Değişimi değerinden ise yüksek olduğu tespit edilmiştir.

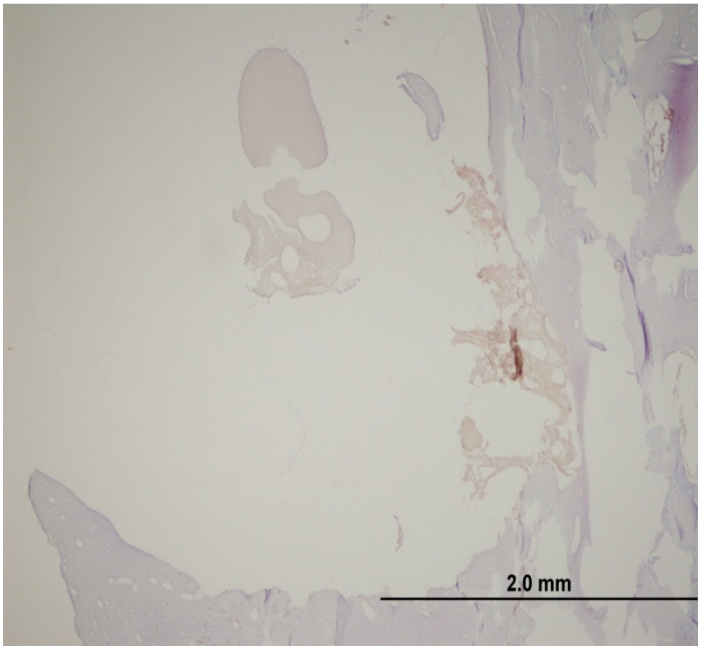
Sol-jel yöntemiyle üretilen HA sentez (N1-7 kodlu) biyo-greftiyle HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftler, ticari greftin morfolojik, fiziksel ve mekanik özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmayı yapmak amacıyla, Yeni Zelenda tavşanının sol tibiasına açılan boşluğa (GAP) ticari greft yerleştirilerek 8 haftalık in vivo deneyi yapılmış ve daha sonra bu kemiğe üç nokta eğme testi uygulanmıştır. Yapılan eğme testi sonucu, defektsiz kemiğin maksimum eğme gerilme değerinin (192 MPa) en yüksek olduğu ve en düşük eğme gerilmesi değerinin de kontrol grubundan (54,5MPa) elde edildiği belirlenmiştir. En yüksek %şekil değişimini ise, N1-7 kodlu HA sentez numunesinin (12,21) verdiği ve en düşük %şekil değişimini de H50Y10 kodlu biyo-greftin (4,94) verdiği gözlenmektedir.

Boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneylerin de boşluğa yerleştirilen biyo-greftlerin dışında bir kontrol grubu oluşturularak biyo-greftlerin kemiğin yenilenmesine ve mekanik özelliklerine etkisi incelendi. Kontrol grubu olarak belirlenen kemiğin eğme testi sonucu elde edilen Gerilme-%Şekil Değişimi grafiği kemiğin sünek bir yapıda olduğu ve 54,5 MPa değeriyle en düşük gerilme değerini verdiği Tablo 4.12 ve Şekil 4.160'da net olarak görülmektedir. Üç nokta eğme testi yapılan bütün kemiklerin elastoplastik enerjileri incelendiğinde, en yüksek elastoplastik enerjiyi ticari greft ile doldurulan kemiğin verdiği gözlenmektedir. Ürettiğimiz biyo-greftler ile doldurulan kemiklerde ise en düşük elastoplastik enerjiyi H50Y10 kodlu biyo-greft ile doldurulan kemik verirken, en yüksek elastoplastik enerjiyi de N1-7 kodlu biyo-greft ile doldurulan kemiğin verdiği gözlenmektedir. Böylece bütün kemiklerin elastoplastik enerjiyle doğru orantılı olan kırılma toklukları karşılaştırıldığında, en düşük kırılma tokluğunu H50Y10 kodlu biyo-greft ile doldurulan kemik verirken, en yüksek kırılma tokluğunu da N1-7 kodlu biyo-greft ile doldurulan kemiğin verdiği belirlenmektedir.

4.6.2.3. I ve II. Gruptaki (H60, H30Ca, H50Y10 Kodlu) Biyo-Greftlerin Doku Cevabına Yönelik Histopatolojik İncelemeleri

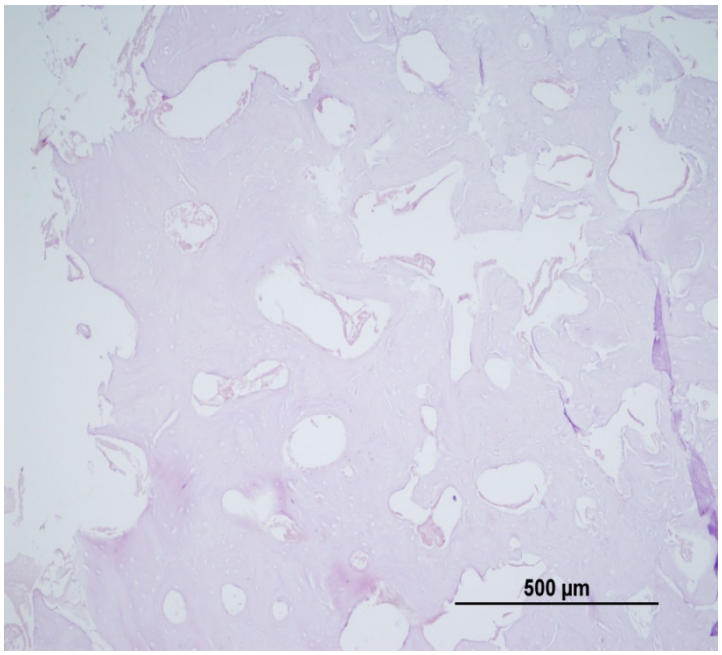
HA esaslı (H60, H30Ca, H50Y10 Kodlu) biyo-greftlerin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası histopatolojik incelemeleri yapmak amacıyla numunelerin hazırlanması, Bölüm 4.6.1.1.'de anlatılan delik (drill) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası numune hazırlığıyla aynıdır. Histopatolojik incelemeler öncesi, biyo-greft dolgulu kemiklerin dekalsifiye olması için formaldehit+su+nitrik asit çözeltisinde 15 gün bekletilmiştir. Dekalsifikasyon işleminden sonra, takip süreci için kemikler etiketlenip kasetlere konulmuştur. Etiketlemeden sonra

sıvı parafin içine içine yerleştirilerek donması beklenmiş ve daha sonra ince bir şekilde kesilerek yüzeyindeki parafin temizlenmiş ve boyanmıştır.



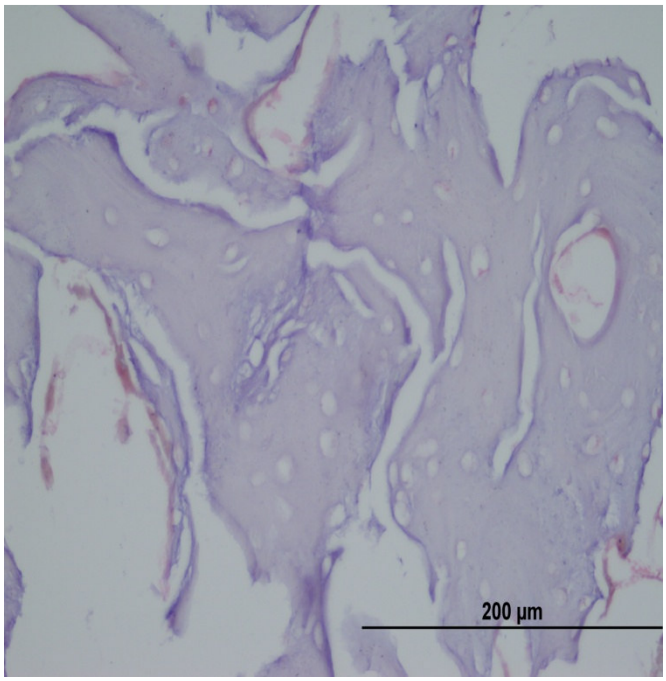
Şekil 4.161. H50Y10 kodlu biyo-greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu

3,2 mm uzunluğunda (genişliğinde) kemik boşluklarına (GAP) yerleştirilen %50HA esaslı ve %10Yttria içerikli (H50Y10 kodlu) biyo-greftin, 8 haftalık in vivo deneyi sonrası sakrifiye edilen tavşan tibiaları eğme testine tabii tutulmuştur. Şekil 4.161 eğme testi sonrası biyo-greft bölgesinde oluşan defekt bölgesinden alınan histopatoloji inceleme sonucunu vermektedir. Yapılan histopatolojik değerlendirmelerde, H50Y10 kodlu biyo-grefte uygulanan eğme testi sonrası defekt bölgesinde bir doku kaybından sonra ortadan kalkan hücrelerin yerini aynı cinsten ve aynı değerde hücrelerin çoğalarak doldurması anlamına gelen rejenerasyonun hiçbir şekilde oluşmadığı ve ölü osteositlerin olduğu gözlenmektedir.



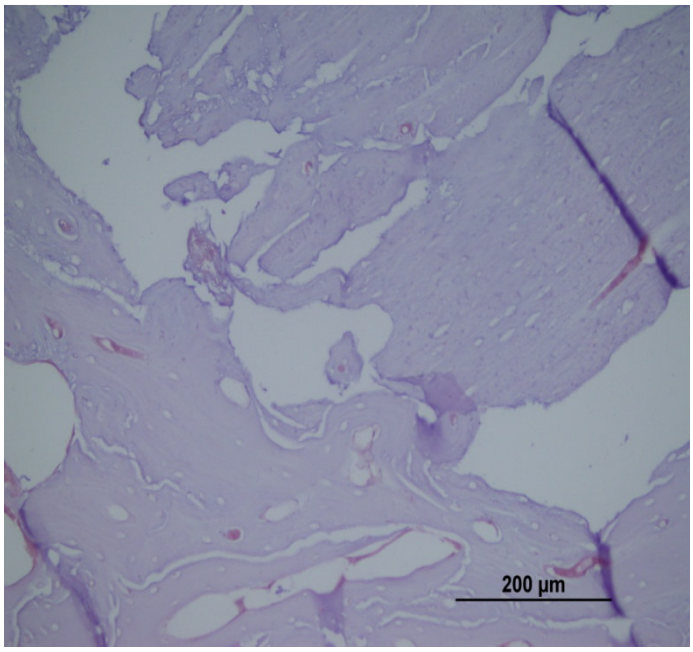
Şekil 4.162. N1-7 kodlu biyo-greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu

3,2 mm uzunluğunda (genişliğinde) kemik boşluklarına (GAP) yerleştirilen pH değeri 7 olan N1-7 kodlu biyo-greftin 8 haftalık in vivo deneyi sonrası sakrifiye edilen tavşan tibiaları eğme testine tabii tutulmuştur. Şekil 4.162 N1-7 kodlu biyo-greftin Bölüm 4.6.2.3'de verilen eğme testi sonrası biyo-greft bölgesinde oluşan defekten alınan histopatoloji inceleme sonucunu vermektedir. Yapılan histopatolojik inceleme sonucunda, hem defekt hem de kemik bölgesinde canlı ve cansız dokuların bir arada olduğu fakat greft bölgesinde kemik bölgesine göre canlı dokuların daha fazla olduğu gözlenmektedir. Defekt bölgesine (GAP) hiçbir greft yerleştirilmeden test edilen kontrol grubunun histopatolojik inceleme sonucuyla kıyaslandığında, N1-7 kodlu biyo-greft içerikli kemiğin defekt bölgesinde canlı dokunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



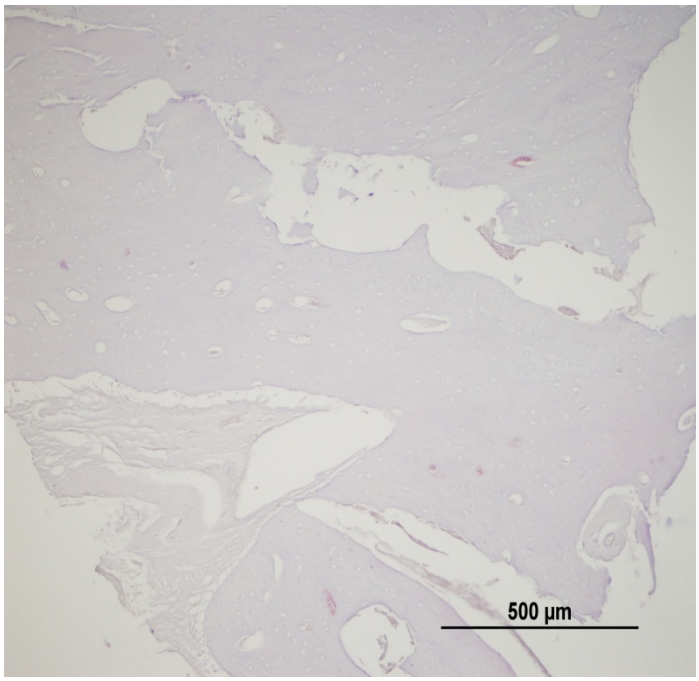
Şekil 4.163. H60 kodlu biyo-greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu

Sol-jel yöntemiyle üretilen HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerin hasarlı kemiğin iyileşmesi ve iyileşme sonrası mekanik etkilerini incelemek amacıyla yapılan 8 haftalı in vivo deneyi sonrası eğme testi uygulanmıştır. Şekil 4.163 %60 HA esaslı (H60 kodlu) alternatif biyo-greftin in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testinde greft bölgesinde oluşan defektin histopatolojik inceleme sonucunu vermektedir. H60 kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan histopatolojik inceleme sonucunda, eğme testinden dolayı oluşan defekt de canlı dokuların olmadığını söylemek mümkündür. Eğme testi sonrası ticari greft kullanıldığı kemiğin histopatolojik inceleme sonucuyla (Şekil 4.163) H60 kodlu biyo-greftin histopatolojik inceleme sonucu kıyaslandığında, H60 kodlu biyo-greftte bulunan cansız dokulardan dolayı daha kötü bir patoloji sonucu verdiği gözlenmektedir.



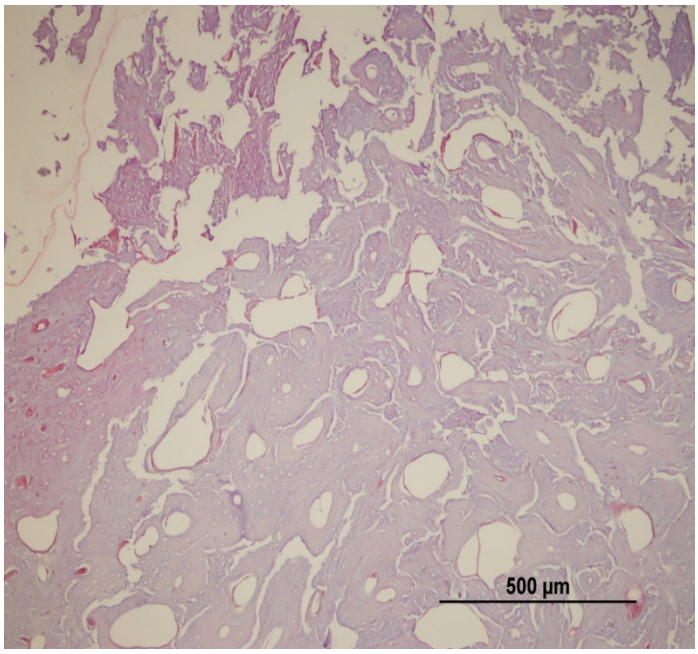
Şekil 4.164. H30Ca kodlu biyo-greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu

HA esaslı ve %10 CaO katkılı (H30Ca kodlu) biyo-greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testinde, greftin olduğu defekt bölgesinden alınan histopatolojik inceleme sonucu Şekil 4.164'de verilmektedir. Histopatolojik inceleme sonucu, canlı bir organizmada hücre ve dokunun patolojik ölümü anlamına gelen nekroz yapının defekt bölgesinde bulunan greft ve kemik üzerinde oluştuğu gözlenmektedir. Ayrıca greft ve kemik bölgesinde oluşan nekrotik bölgenin yanında hem greft hemde kemik bölgesinde canlı dokuların da bulunduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.165. Kontrol grubunun boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu

Boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyinde defekt bölgelerine biyo-greft yerleştirilerek kemiğin onarımı üzerinde biyo-greftlerin etkileri incelenmiştir. Bunun dışında boşluğa hiçbir biyo-greft yerleştirilmeden bir kontrol grubu oluşturularak biyo-greft ile doldurulan defekt bölgeleriyle kıyaslanmıştır. Şekil 4.165 kontrol grubunun boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testinde, defekt bölgesinden alınan histopatolojik inceleme sonucunu vermektedir. Histopatolojik inceleme sonucu, defekt bölgesinde yoğun bir cansız doku alanının oluştuğu, bunun yanında hem greft hemde kemik bölgesinde cansız dokulla birlikte çok az miktarda canlı dokuların da bulunduğu görülmüştür.



Şekil 4.166. Ticari greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası uygulanan eğme testi kırık bölgesinin histopatolojik inceleme sonucu

Canlı bir organizmada hücre ve dokunun patolojik ölümü olan nekroz, hücre ölümünden bir süre sonra çekirdekte erime ya da parçalanmalara ve sitoplazmada dejenerasyon ve erimelere neden olur. Nekrozu yapan etkenin gücü, süresi ve hücrelerin etkene karşı duyarlılığı nekrozun büyüklüğünde rol oynar. Şekil 4.166 ticari greftin boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası eğme testinde greftin bulunduğu defekt bölgesinden alınan histopatolojik inceleme sonucunu vermektedir. Yapılan inceleme sonucu, ticari greftin bulunduğu defekt bölgesinde eğme testi hasarından dolayı nekrotik yapılarla birlikte canlı dokularında bulunduğu karışık bir patoloji sonucunu verdiği görülmektedir. Ayrıca hem ticari greft hemde kemik bölgelerinde canlı osteositlerin olduğu net olarak gözlenmektedir.

4.7. İN VİTRO ANALİZLERİ

4.7.1. Sitotoksisite Deneyleri

Farklı kompozisyonlarda sol-jel yöntemiyle hazırlanan HA esaslı biyo-greftlerin toksik etki gösterip göstermediğini incelemek amacıyla sitotoksisite deneyleri yapılmıştır. Sitotoksisite deneyinin ilk aşaması, hücrelerin numuneler üzerinde büyüyebilmesi için tamamen çözündürülmesidir. Bu amaç doğrultusunda bütün biyo-greftleri çözündürmek için, DMSO, DMF, Xlyene, NaOH, KOH, HCl, Metanol, Etanol, KCl gibi farklı çözücüler kullanılmıştır. Biyo-greftlerin bu çözücülerden DMSO, DMF, Xlyene, Metanol ve Etanol çözeltilerinde çözünmediği ve NaOH, KOH, HCl çözeltilerinde süspanse şekilde yarı çözündüğü görülürken, sadece KCl çözeltisinde tam bir çözünmenin olduğu görülmüştür. Bunun için 1mol KOH ve HCl çözeltileri karıştırılarak KCl çözeltisi hazırlanıp, üretilen greftler ilave edildikten sonra oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırılarak çözündürme işlemi tamamlanmıştır. Daha sonra karışımın konsantrasyonunu 1mg/ml'e düşürmek amacıyla DMEM çözeltisi ilave edilmiştir.

Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz birkaç farklı (N1-7, H60, H30Ca, H50Y10, H40ZrYt, H30G20, H10G75, S30G20, S13G75, L40G20, L10G75, B40G20 ve B10G75 kodlu) biyo-greftin sitotoksisite testlerinde osteoblast kemik hücreleri kullanılarak, osteoblast hücrelerinin kemik hücresine dönüşmesini ve dönüşümün miktarını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmadaki sitotoksite testlerinde, L929 fare fibroblast ve osteoblast (hfob) hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin toksisite değerlendirmesi MTS (hücre proliferasyonu testi) (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil) tetrazolium, (CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay) testi ile 96 kuyucuklu kültür kaplarında yapılmıştır. Öncelikle hücreler, her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde 100 µl besi yeri içerisinde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilip 24 saat büyümeye bırakılmıştır. Ertesi gün, bu besi yeri çekilmiş ve üzerine hücrelerle muamele edilmek istenen konsantrasyonlar besi yeri(DMEM) içindeki hücrelere eklenmiştir. Negatif kontrol olarak besi yeri (DMEM) ve pozitif kontrol olarak ise %20 DMSO kullanılmıştır. İnkübasyon süreleri bittiğinde kuyucuklardaki besi yeri çekilip ve 10 µl MTS+100 µl besi yeri olacak şekilde bu kuyucuklara eklenmiştir. MTS ile maruz bırakılan hücreler 2-3 saat %5 CO_2'de 37ºC'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında hücre canlılığı 490 nm'de otomatik petri okuyucu (Elisa pleyt okuyucusu) ile ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda (0,1-0,5µm/ml) ve 24-72 saat aralıklarında kuyucuklardaki hücreler ölçülerek greftlerin toksik özelliği incelenmiştir. Aşağıdaki Şekil 4.167 ve Tablo 4.13-4.16'da gösterilen günlere göre hücre değişim farkı ile eklenen hücrelerdeki hücre sayısındaki değişimi hesaplanarak, biyo-greft malzemelerin uygulandığı hücrelere herhangi bir toksik etki yapıp yapmadığı ve farklı greftlerin hücre değişimine etkileri incelenmiştir.

Tablo 4.13. H60 kodlu biyo-greftin L929 hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri

H60					
	0.1 ug/ml	**0.2 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.4 ug/ml**	**0.5 ug/ml**
1. Gün	110,3299	94,32125	35,53272	-1,18983	-0,81125
2. Gün	113,4298	133,2645	116,1157	7,024793	-0,9814
3. Gün	89,53219	76,24282	51,0077	0,659582	-0,69623

Tablo 4.14. H30Ca kodlu biyo-greftin L929 hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri

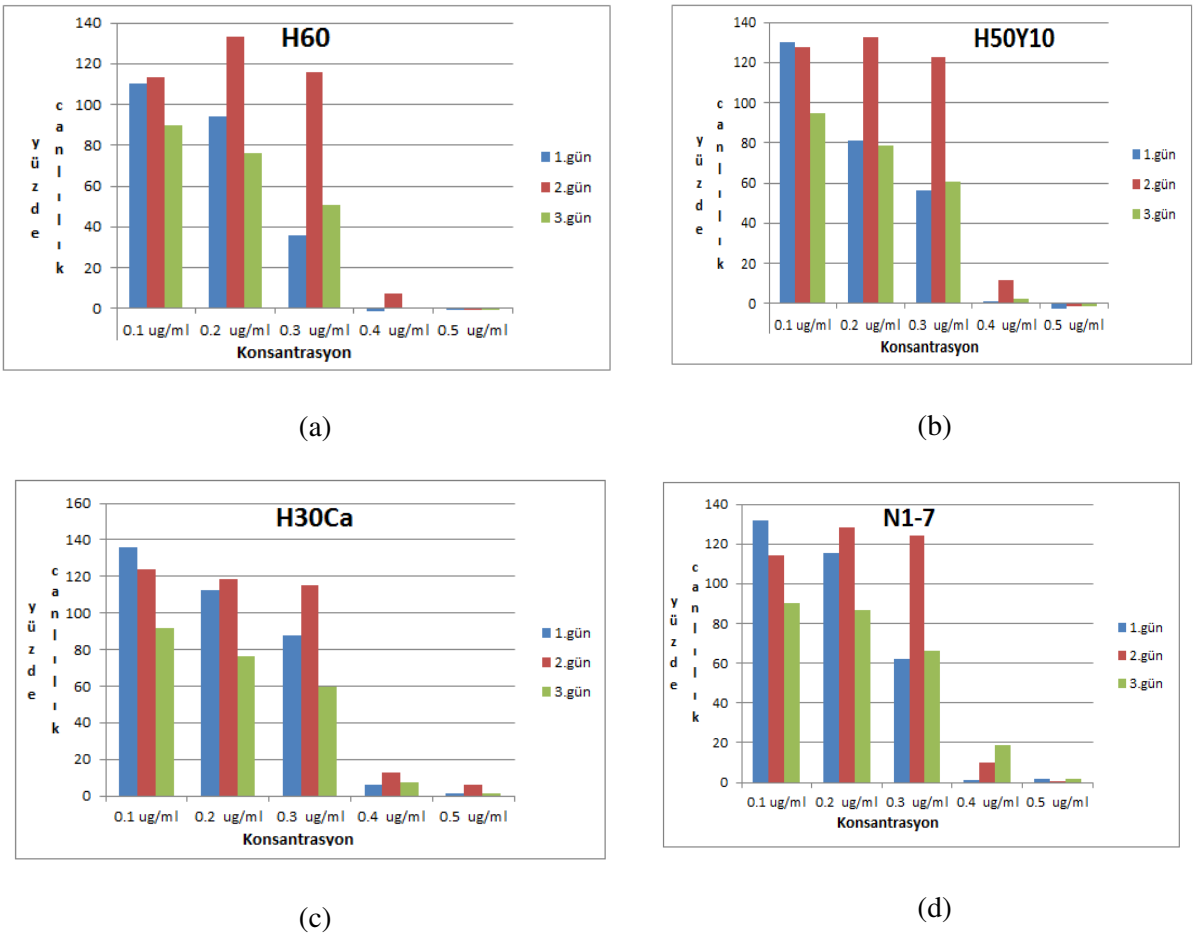
H30Ca					
	0.1 ug/ml	**0.2 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.4 ug/ml**	**0.5 ug/ml**
1. Gün	135,5868	112,7096	87,88534	6,219578	1,406165
2. Gün	124,0186	118,5434	114,8244	12,80992	6,353306
3. Gün	91,86515	76,14511	59,39905	7,658483	1,392451

Tablo 4.15. H50Y10 kodlu biyo-greftin L929 hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri

H50Y10					
	0.1 ug/ml	**0.2 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.4 ug/ml**	**0.5 ug/ml**
1. Gün	130,0703	81,34127	56,51704	0,919416	-2,86641
2. Gün	127,4793	132,7996	122,8306	11,88017	-1,39463
3. Gün	94,43019	78,74679	60,71821	2,052034	-1,39245

Tablo 4.16. N1-7 kodlu biyo-greftin L929 hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri

N1-7					
	0.1 ug/ml	**0.2 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.4 ug/ml**	**0.5 ug/ml**
1. Gün	131,9632	115,4678	62,35803	1,243916	1,946998
2. Gün	114,3079	128,0475	124,4318	9,762397	0,619835
3. Gün	90,14291	86,62514	66,28802	18,94467	1,758886



Şekil 4.167. Üretilen biyo-greftlerin L929 hücre kültürü kullanılarak yapılan sitotoksisite deney sonuçları: Yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) H60, b) H50Y10, c) H30Ca, d) N1-7

Sol-jel yöntemiyle üretilen HA esaslı greftlerin L929 tipi fare fibroblast hücresi ile farklı günlerde ve farklı konsantrasyonlarda yapılan sitotoksisite deneylerinde toksisite sonuçları MTS testi ile kültür kaplarında ölçülmüş ve Şekil 4.167 (a-d)' de verilmektedir. H60 kodlu greftin farklı konsantrasyonlarda ve farklı günlerde yapılan hücre ölçümleri sonucu; hücre miktarının artışına bağlı olarak 1 ve 2. gün 0.1 µm/ml konsantrasyonunda toksik özellik göstermediği görülürken, 3. gün bu özelliğin azaldığı görülmektedir. H60 kodlu greftin 0.2 ve 0.3 µm/ml konsantrasyona sahip karışımında ise, 1 ve 3. gün hücre sayısında azalma görülürken 2. gün hücre sayısında artış görülmektedir. H30Ca ve N1-7 kodlu greftlerde 0.1-0.2 µm/ml konsantrasyonlarda 1 ve 2. gün hücre sayısında artış görülürken, 3. gün hücrelerin azaldığı görülmüştür, 0.3µm/ml konsantrasyonda ise hücre artışı sadece 2. gün görülmüştür. H50Y10 kodlu greftte ise 0.1 µm/ml konsantrasyonda hücre sayısında 1 ve 2. gün, 0.2-0.3 µm/ml konsantrasyonlarda ise sadece 2. gün artış görülürken, 1 ve 3. günde hücrelerin azaldığı görülmüştür. Bütün greftlerin 0.4-0.5 µm/ml konsantrasyonlarına sahip karışımlarında ise, greft konsantrasyonunun hücre çoğalması için fazla geldiği görüldüğünden dolayı hücre miktarının azaldığı görülmektedir.

Tablo 4.17. N1, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu biyo-greftlerin osteoblast hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri

Gün	N1		N1-5		N1-7		N1-9	
	0.1 ug/ml	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**
1.gün	128,8971	133,5798	102,0833	106,25	101,6636	100,9242	128,1577	129,39
2.gün	107,0078	135,5209	105,8278	106,8874	127,2154	125,139	127,1413	118,9099
3.gün	147,8689	161,1293	101,444	91,8572	138,3607	124,3716	149,7632	118,5792

Tablo 4.18. H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu biyo-greftlerin osteoblast hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri

Gün	H60		H30Ca		H50Y10	
	0.1 ug/ml	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**
1.gün	124,0162	127,9514	102,2181	102,403	101,6636	100,9242
2.gün	127,4172	147,7263	135,2243	116,3886	127,2154	125,139
3.gün	165,5034	115,0421	158,3607	149,7632	138,3607	124,3716

Tablo 4.19. H30G20, H10G75, S30G20 ve S13G75 kodlu biyo-greftlerin osteoblast hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim değerleri

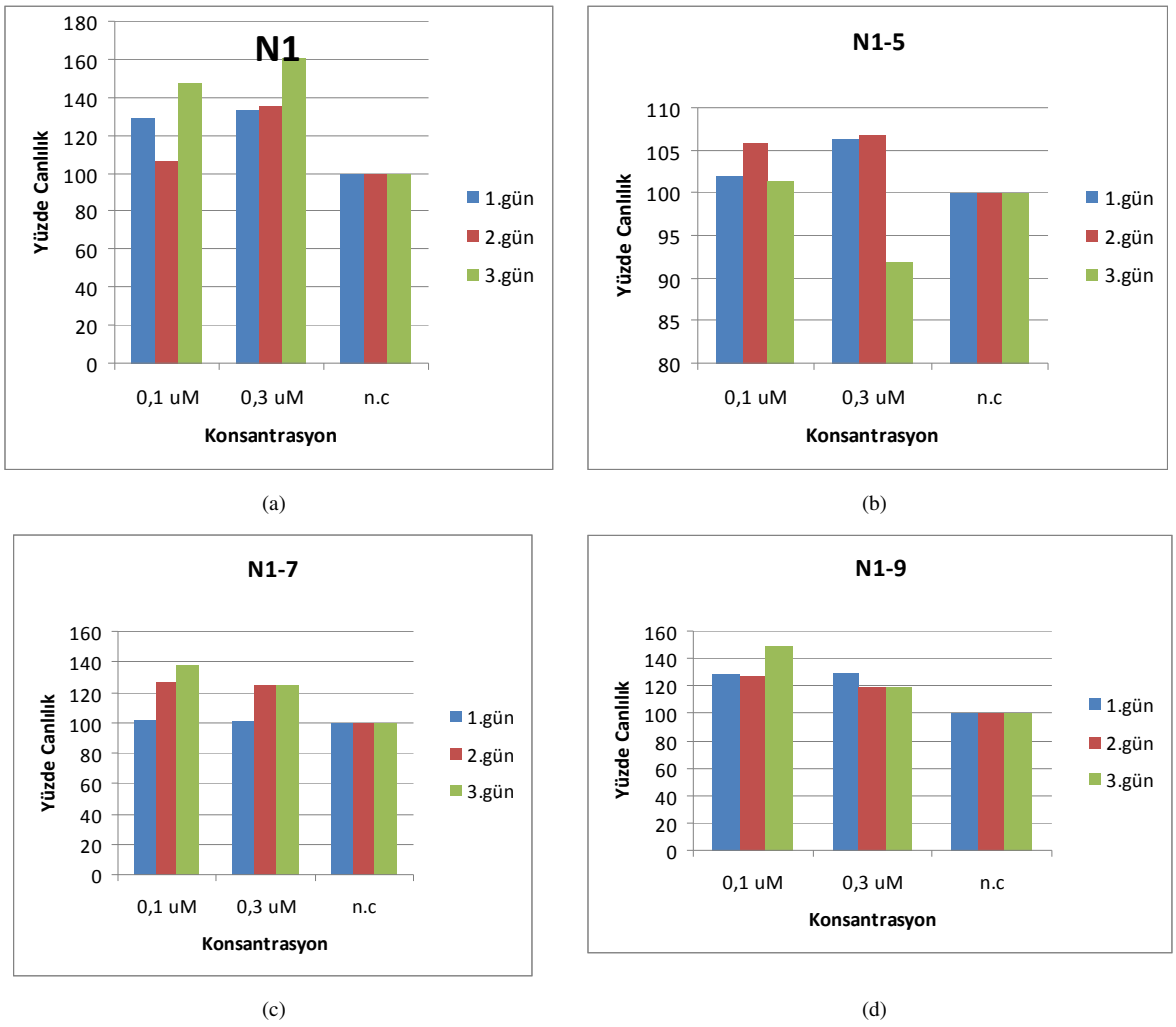
Gün	H30G20		H10G75		S30G20		S13G75	
	0.1 ug/ml	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**
1.gün	144,4239	139,4948	73,93715	109,0573	100,9242	118,6691	118,4606	125,8681
2.gün	139,6737	132,9996	87,98665	97,55284	116,9818	119,7998	112,5828	124,9007
3.gün	170,6011	150,0546	104,8087	147,5774	141,9672	159,3807	122,9844	119,6149

Tablo 4.20. L40G20, L10G75, B40G20 ve B10G75 kodlu biyo-greftlerin osteoblast hücre kültürüyle yapılan sitotoksisite deneyi sonucu günlere göre hücre değişim farkı değerleri

Gün	L40G20		L10G75		B40G20		B10G75	
	0.1 ug/ml	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**	**0.1 ug/ml**	**0.3 ug/ml**
1.gün	124,2144	76,52495	122,6273	112,5	97,56944	122,0486	111,8299	102,403
2.gün	117,8717	71,15313	159,7351	149,6689	116,2914	128,83	119,5773	128,5502
3.gün	108,6339	44,15301	125,3911	150,9025	112,0337	139,3502	149,0346	161,5665

Tablo 4.17-Tablo 4.20 arasında N1, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu HA sentez biyogreftleriyle, H60, H30Ca, H50Y10, H30G20 H10G75, S30G20, S13G75, L40G20, L10G75, B40G20 ve

B10G75 kodlu HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftlerin 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlar da osteoblast kemik hücreleri kullanılarak yapılan sitotoksisite testlerinde, hücrelerin kemik hücrelerine dönüşüm hızı ve miktarını vermektedir.

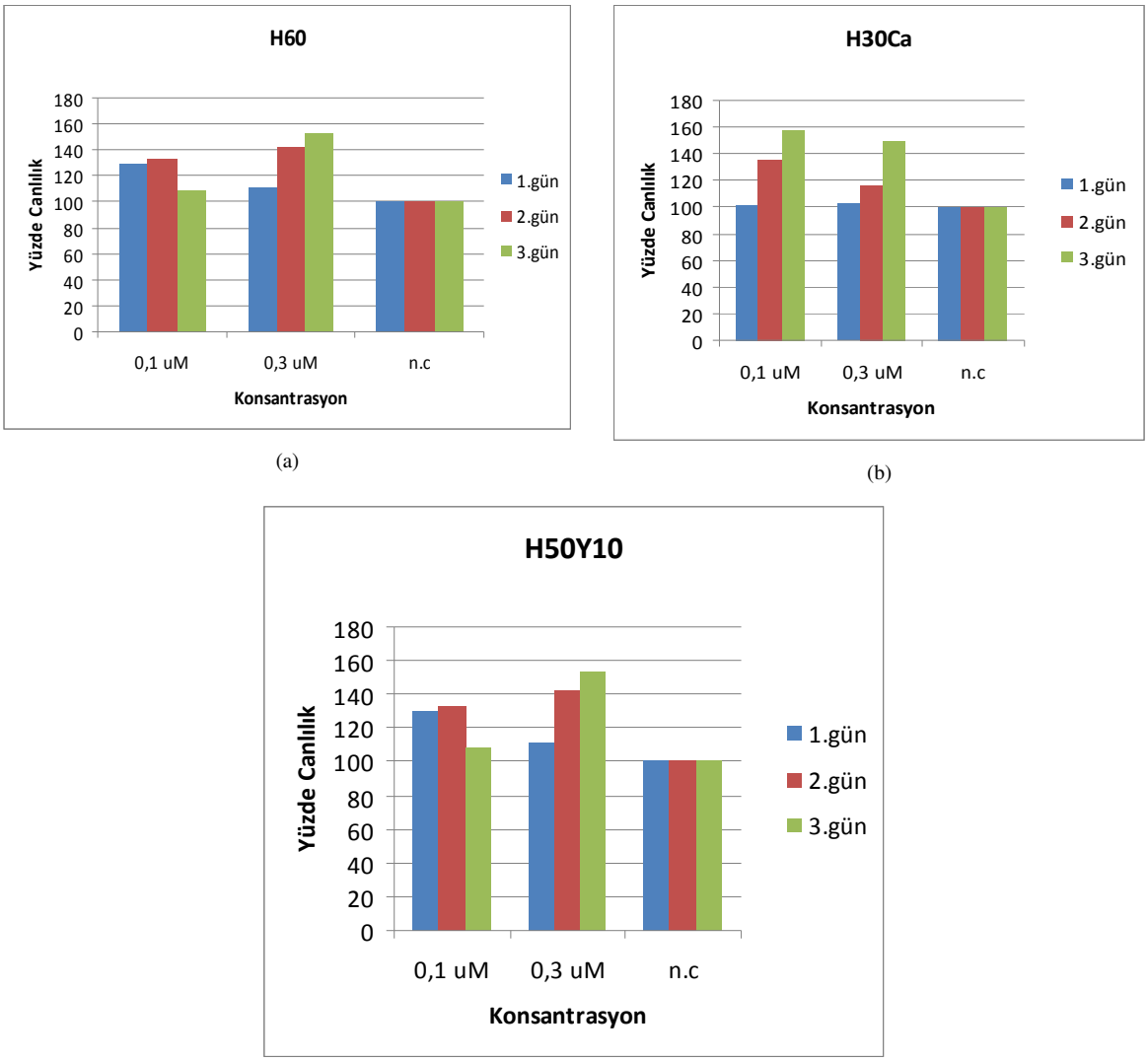


Şekil 4.168. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) N1-12, b) N1-5, c) N1-7, d) N1-9.

pH değeri 12 olan HA sentez (N1-12 kodlu) biyo-greftinin pH değeri, NH_4OH ve fosforik asit gibi tamponlar kullanılarak 5, 7 ve 9 olarak (N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu) değiştirilmiştir. Sitotoksisite testlerine tabi tutulan bütün biyo-greftler KCl çözeltisinde çözündürüldükten sonra 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlarda in vitro deneylerine tabi tutulmuştur. Şekil 4.168, 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlarda çözündürülen (N1-12, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu) biyo-greftlerin osteoblast hücreleriyle yapılan 3 günlük sitotoksisite testleri sonrası yüzde canlılık sonuçlarını vermektedir.

Yapılan incelemeler sonucu, 0.1 ug/ml konsantrasyon da yapılan 3 günlük sitotoksisite deneyleri sonrası pH değeri en düşük olan N1-5 kodlu biyo-greft hariç diğer bütün HA sentez (N1,

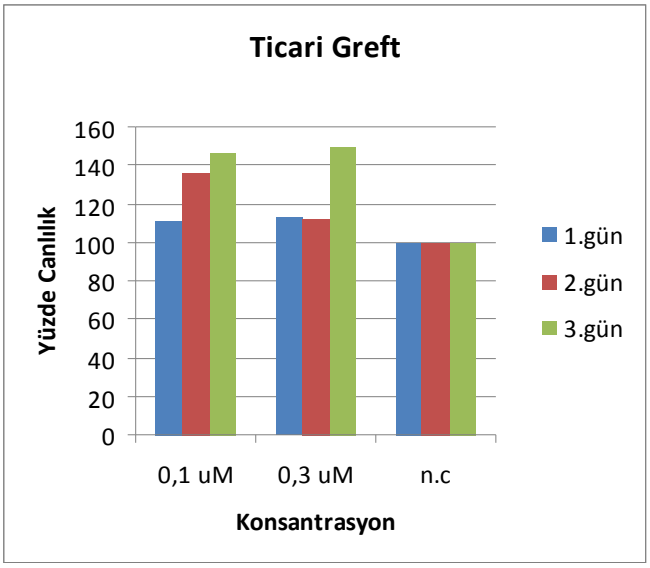
N1-7 ve N1-9 kodlu) biyo-greftlerin yüzde canlılık oranlarında artış olduğu gözlenmiştir. N1-12 ve N1-7 kodlu biyo-greftin kullanıldığı (0.3 ug/ml konsantrasyonda) testlerde yüzde canlılık oranının artığı görülürken, N1-9 ve N1-5 kodlu biyo-greftlerin yüzde canlılık oranının ilk güne göre düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.169. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) H60, b) H30Ca, c) H50Y10.

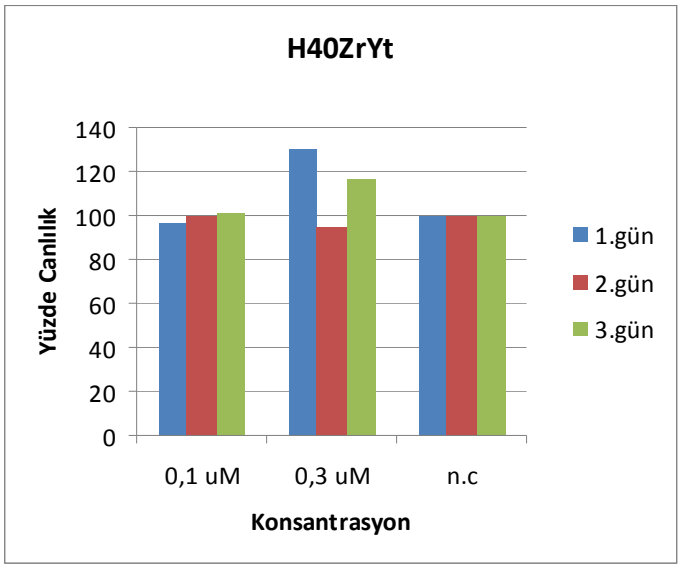
Sitotoksisite testlerine tabi tutulan HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) bütün biyo-greftler, 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlarda KCl çözeltisinde çözündürülmüşlerdir. Şekil 4.169 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlarda çözündürülen (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerin osteoblast hücreleriyle yapılan 3 günlük sitotoksisite testleri sonrası yüzde canlılık sonuçlarını vermektedir.

0.1 ug/ml konsantrasyonda yapılan sitotoksisite testleri sonucu, H60 ve H50Y10 kodlu biyo-greftler de konsantrasyon miktarı düşük olduğundan dolayı üç gün sonunda hücre canlılık oranının düştüğü görülürken, %30 HA esaslı ve %10 CaO içerikli (H30Ca kodlu) biyo-greftte hücre canlılık oranının arttığı gözlenmiştir. 0.3 ug/ml konsantrasyonda yapılan sitotoksisite testlerinde ise, H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu bütün biyo-greftlerin üçüncü gün sonunda hücre canlılık oranının yükseldiği tespit edilmiştir.



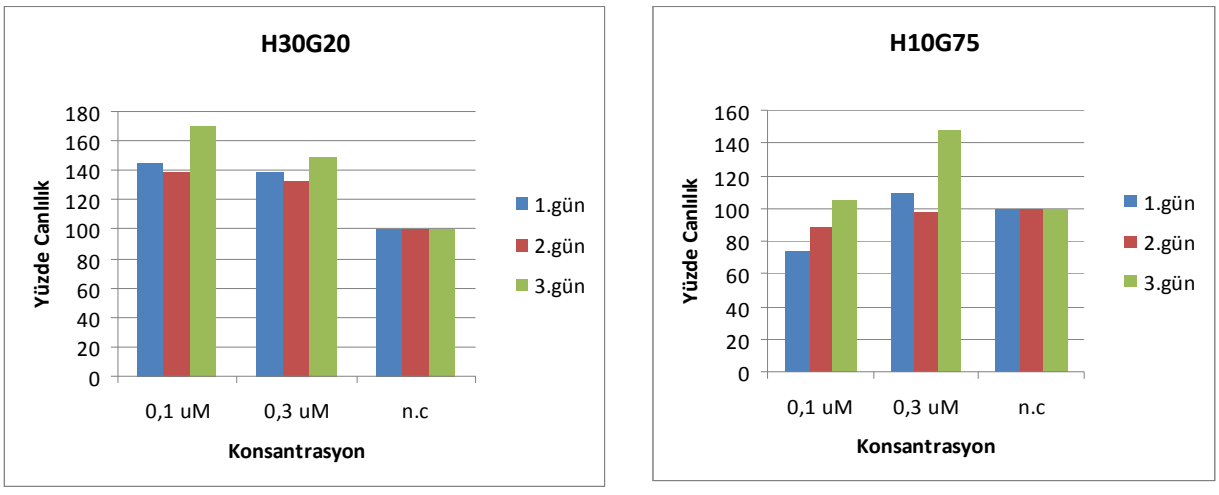
Şekil 4.170. Ticari (Onspine) greftinin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi

Şekil 4.170 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlar da KCl çözeltisinde çözündürülen ticari greftin (Onspine) osteoblast hücreleriyle yapılan 3 günlük sitotoksisite testleri sonrası yüzde canlılık sonuçlarını vermektedir. Sitotoksisite testleri sonucuna göre, 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlarda ticari greftin hücre canlılık oranını belirgin bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir.



Şekil 4.171. H40ZrYt kodlu biyo-greftin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi

H40ZrYt kodlu biyo-greftin 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlar da osteoblast hücre kültürü kullanılarak yapılan sitotoksisite deney sonuçları Şekil 4.171'de vermektedir. Yapılan inceleme sonucu, %40 HA esaslı ve Zr ile Yttria içerikli (H40ZrYt kodlu) biyo-greftin 0.1ug/ml konsantrasyon da yüzde canlılık oranının düşük miktarda arttırdığı gözlenirken, 0.3 ug/ml'lık yüksek konsantrasyon da yüzde canlılık oranını düşürdüğü, fakat değerin 100'ün altına düşmediği belirlenmiştir.

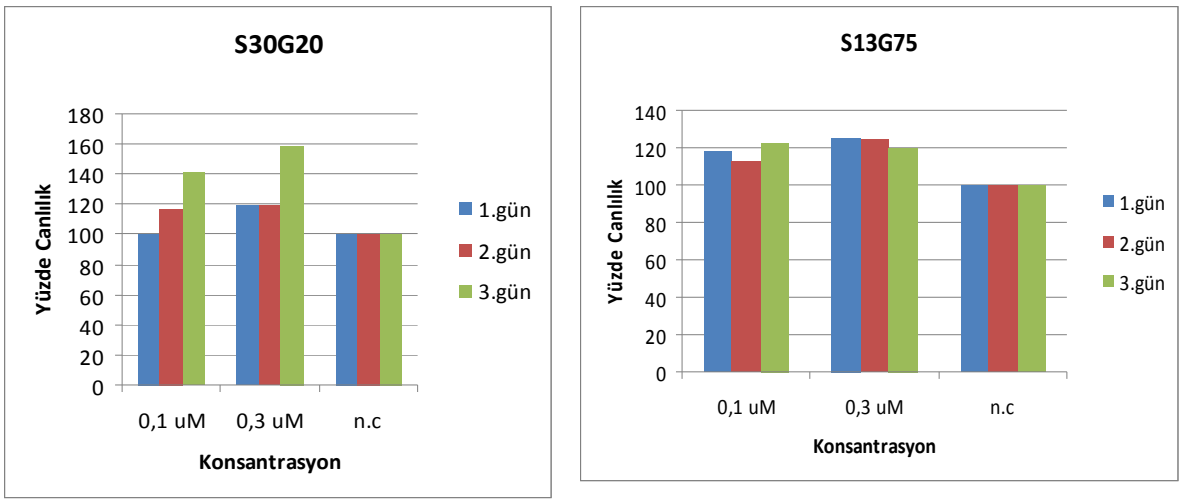


(a) (b)

Şekil 4.172. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) H30G20, b) H10G75.

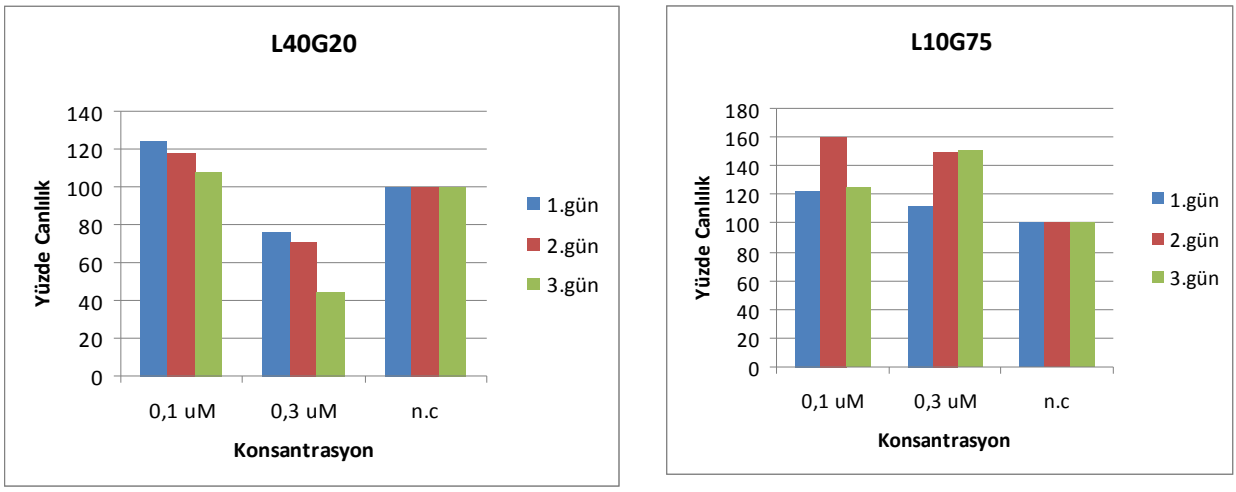
HA esaslı biyo-greftlerden poroz yapı elde edebilmek için düşük sıcaklıkta yapıdan uzaklaşarak bulunduğu bölgede boşluk oluşturan polimer malzeme (jelatin) kullanılmıştır. Biyo-

greftlere farklı oranlarda jelatin ilave edilerek porozite miktarını ne kadar etkilediği test edilmiştir. Şekil 4.172 (a-b) %30-%10 HA esaslı ve %20-%75 jelatin içerikli (H30G20 ve H10G75 kodlu) biyo-greftlerin farklı (0.1-0.3 ug/ml) konsantrasyonlar da osteoblast hücre kültürü kullanılarak yapılan sitotoksisite deney sonuçlarını vermektedir. Sitotoksisite deney sonuçlarına göre, her iki konsantrasyonda da H30G20 ve H10G75 kodlu biyo-greftlerin hücre canlılık oranlarını arttırdığı gözlenmiştir.



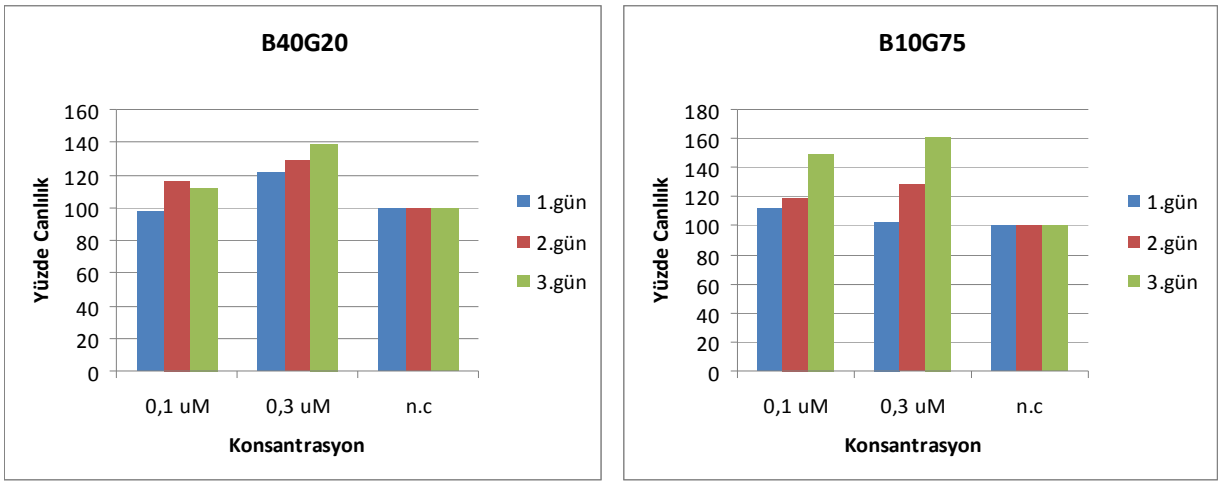
Şekil 4.173. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canılılığının gün ve dozlara göre değişimi a) S30G20, b) S13G75.

Sol-jel yöntemiyle üretilen sübye kemiği esaslı ve jelatin içerikli (S30G20 ve S10G75 kodlu) biyo-greftlerin osteoblast hücresi ile farklı (1-3.) günlerde ve farklı (0.1-0.3 ug/ml) konsantrasyonlar da yapılan sitotoksisite deneyinde toksisite sonucu MTS testi ile kültür kaplarında ölçülmüştür. Şekil 4.173 S30G20 ve S10G75 kodlu biyo-greftlerin 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlar da osteoblast hücre kültürü kullanılarak yapılan sitotoksisite deney sonuçlarını vermektedir. S30G20 kodlu biyo-greftin farklı konsantrasyonlarda ve farklı günlerde yapılan hücre ölçümleri sonucu; 0.1-0.3 µm/ml konsantrasyonlar da üçüncü gün sonunda hücre miktarının artışına bağlı olarak toksik özellik göstermediği görülmektedir. S13G75 kodlu biyo-grefttin 0.1µm/ml konsantrasyonun da 3. gün sonunda hücre sayısında artış görülürken, 0.3µm/ml konsantrasyonda 3. gün sonunda hücre sayısında düşüş olduğu gözlenmektedir. Fakat S13G75 kodlu biyo-grefttin 0.3µm/ml konsantrasyonda yapılan sitotoksisite deneyleri sonucu 3. gün sonunda yüzde canlılık değerinin 100'ün altına düşmediği de tespit edilmiştir.



Şekil 4.174. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) L40G20, b) L10G75.

Lületaşı esaslı ve %20- %75 jelatin katkılı (L40G20 ve L10G75 kodlu) biyo-greftlerin 0.1-0.3 ug/ml konsantrasyonlar da osteoblast hücre kültürü kullanılarak yapılan 3 günlük sitotoksisite deney sonuçları Şekil 4.174'de verilmektedir. Yapılan inceleme sonucu, L40G20 kodlu biyo-greftin 0.1ug/ml konsantrasyon da 1. gün yüzde canlılık oranını arttırdığı gözlenirken 2 ve 3. gün sonunda yüzde canlılık oranının düştüğü, fakat bu düşüş sonunda hücre canlılık miktarının 100'ün üzerinde olduğu görülmüştür. L40G20 kodlu biyo-greftin 0.3ug/ml konsantrasyon da ilk günden itibaren hücre miktarını düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçta, L40G20 kodlu biyo-greftin 0.3ug/ml konsantrasyon da toksit etkisi olduğunu göstermektedir. L10G75 kodlu biyo-greftin ise, 0.1ug/ml konsantrasyon da 3. gün sonunda yüzde canlılık oranını arttırdığı, fakat bu artışın 2. gün sonunda maksimum olduğu ve 3. gün düştüğü gözlenmiştir. L10G75 kodlu biyo-greftin 0.3ug/ml konsantrasyon da 3. gün sonunda hücre canlılık oranının net bir şekilde ve doğrusal olarak arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.175. Üretilen biyo-greftlerin yüzde hücre canlılığının gün ve dozlara göre değişimi a) B40G20, b) B10G75.

Biyocam esaslı ve %20-%75 jelatin içerikli (B40G20 ve B10G75 kodlu) biyo-greftlerin farklı (0.1-0.3 ug/ml) konsantrasyonlar da osteoblast hücre kültürü kullanılarak yapılan 3 günlük sitotoksisite deney sonuçları Şekil 4.175(a-b) verilmektedir. Sitotoksisite deney sonuçlarına göre, her iki (0.1-0.3 ug/ml) konsantrasyonda B40G20 ve B10G75 kodlu biyo-greftlerin hücre canlılık oranlarının günlere göre doğru orantılı olarak arttırdığı gözlenmiştir. Bu sonuca bağlı olarak, B40G20 ve B10G75 kodlu biyo-greftlerin farklı (0.1-0.3 µm/ml) konsantrasyonlarda ve farklı (1-3.) günlerde yapılan hücre ölçümleri sonucu; hücre miktarındaki istikrarlı artışa bağlı olarak toksik özellik göstermediği tespit edilmiştir.

5.TARTIŞMA

Sentetik biyo-greft üretimi, 1980'li yılların ikinci yarısında malzeme bilim adamları tarafından gündeme getirilmiş ve takip eden yıllardan günümüze kadar gelen süre zarfında da biyomedikal alanda hızlı bir gelişim göstermiştir. Kemik defekti onarımında kullanılacak biyomalzemeleri doğal malzemeler, seramikler, metaller, kompozitler ve polimerik malzemeler olmak üzere beş gruba ayırabiliriz. Defekt onarımında kullanılabilecek biyomalzeme yelpazesi geniş olsa da yeni bir biyomalzeme geliştirilmesinde araştırmacıların dikkat etmesi gereken özellikler biyouyumluluk, biyobozunurluk, enflamasyona neden olmama ve kullanılacak olan kemiğe fiziksel ve mekanik açıdan benzer özellikler sergileme gibi etkenler göz önünde tutulmalıdır.

Bu tez çalışmasının amacı, kemik defekti onarımında kullanılmak üzere iç yapı, mekanik özellikler, biyouyumluluk ve biyoaktivite özellikleri yönünden kemik ile benzer özellikler gösterebilecek biyo-greftlerin üretilmesi ve bunların ayrıntılı olarak incelenmesidir. Bu nedenle öncelikle, I. grupta, $Ca(OH)_2$ ve fosforik asit kullanılarak HA sentez biyo-greftleri üretilmiştir. Daha sonra HA sentez biyo-greftlerinin pH değerleri 12, 9, 7 ve 5 yapılarak pH farkının HA üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kemiğin ana bileşen malzemesi olan doğal HA'de CO_3^{-2}, Mg^{+2}, F^- gibi çeşitli iyonlar bulunduğundan dolayı, HA'e değişik bileşikler ilave edilerek bu bileşiklerin HA üzerindeki morfolojik, fiziksel ve kimyasal etkileri incelenmiştir[37-39, 201]. Bundan dolayı yapılan çalışmada, II. grup biyo-greftlerinde, HA'e CaO, P_2O_5, KH_2PO_4, Na_2CO_3 ve Yttria gibi bileşikler ilave edilerek bu bileşiklerin etkileri test edilmiştir. III. grupda, mikron ve nano boyutta HA'e $CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içeriğine sahip sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu tozu ilave edilerek hem farklı boyutlardaki HA'in hemde sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu gibi doğal ürünlerin etkileri incelenmiştir. IV. grupta, poroz yapıya sahip biyocam, HA, sübye kemiği ve lületaşı esaslı biyo-greftler üretilerek poroz ve kompakt yapıdaki biyo-greftlerin kimyasal, fiziksel ve biyomekanik etkileri belirlenmiştir.

Preslenebilirlik; akma sınırı, numune sertliği ve boşluk oranıyla birlikte taneciklerin şekli ve boyutlarının bir fonksiyonudur. Preslenebilirlik deneyi biyogreftlerin kompakt haldeyken elde edilen yoğunluğuna karşılık gelir. Sol-jel yöntemiyle üretim sonrası preslenen numuneler yüksek sıcaklıkta kontrollü atmosferde sinterlenmeden önce ve sonra ağırlıkları ve boyutları ölçülerek yoğunlukları hesaplanmıştır. Yaptığımız yoğunluk hesaplamaları sonucunda hidroksiapatit esaslı biyo-greftlerde sinterlemenin etkisiyle yoğunluğun arttığı belirlenmiştir. Ayrıca hidroksiapatit sentez malzemelerinde en yüksek yoğunluğun pH değeri 5 olan HA sentez (N1-5 kodlu) numunesinden elde edildiği görülürken, pH değeri değiştirilen HA sentez numunelerinde pH değeri arttıkça yoğunluğun düştüğü görülmüştür. Yoğunluktaki bu düşüş numunelerde gözenekli yapının oluştuğunu göstermiştir. Sinterleme işleminde sıcaklık artışı difüzyon hızını arttırdığından dolayı

numunelerdeki gözeneklerin kapanmasını sağlamış ve buna bağlı olarak hidroksiapatit esaslı biyo-greftlerin yoğunluğunun artmasına neden olmuştur. HA sentez biyo-greftlerinde sinterleme sonrası N1-12, N1-7 ve N1-9 kodlu biyo-greftler de gözenekli yapının oluştuğu ve N1-5 kodlu biyo-greftte gözeneklerin kapandığı Bölüm 4.3.1'deki SEM görüntülerin de gözlenmektedir. (Şekil 4.28- Şekil 4.35) Sonuçta, bütün HA sentez biyo-greftlerinin sinterleme öncesi ve sonrası yapılan hacim ve ağırlık ölçümlerinden, biyo-greftlerin hacim ve ağırlıklarındaki düşüşe bağlı olarak biyo-greftlerin yoğunluklarında düşüş veya artış olduğu görülmektedir. pH değerleri farklı olan HA sentez biyo-greftlerinde (N1-12, N1-5, N1-7, N1-9 kodlu) pH değeri 12'nin altında olan biyo-greftler de yoğunluğun düşük olduğu ve pH değeri 5, 7, 9 olan biyo-greftler de ise en yüksek yoğunluğu pH=5 olan N1-5 kodlu biyo-greftin verdiği belirlenmiştir. N1-5 kodlu biyo-greftin kompakt SEM morfolojisi, yoğunluğun en yüksek oluşunun mikroyapıdan kaynaklı olduğunu göstermektedir.

Sinterlenmiş olan N1-12, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu biyo-greftlerin karakterizasyon çalışmalarında FTIR ve XRD spektrum tekniklerinden faydalanılmıştır. Yapılan FTIR incelemeleri sonucu, farklı pH değerlerine sahip HA sentez (N1-12, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu) biyo-greftlerinin 1086.92, 1021.92 ve 961.95 cm^{-1} arasındaki pik şiddetlerinde ve HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerin ise 1023.54, 962.46, 973.94 cm^{-1} pikler şiddetlerinde HA ve β-TCP bileşiklerine bağlı PO_4^{-3} piklerinin oluştuğu gözlenmektedir. Mikron ve nano boyutta HA esaslı ve sübye kemiği katkılı (M-H30S20, M-H30S30, M-H30S40 kodlu ve N-H30S20, N-H30S30, N-H30S40 kodlu) biyo-greftler (III. Grup) 1167.77-962.78 cm^{-1} pik aralığında HA ve sübye kemiği tozuna bağlı PO_4^{-3} piklerini verirken, M-H30S20, M-H30S30 ve M-H30S40 kodlu biyo-greftler sübye kemiği tozunda bulunan $CaCO_3$ bileşiklerine bağlı olarak 2987.53 cm^{-1} değerinde CO_3^{-2} pikini vermektedir(Şekil 4.6). Ayrıca farklı oranlarda sübye kemiği tozu içerikli alternatif biyo-greftler kıyaslandığında ise, mikron boyutta HA içerikli biyo-greftte sübye kemiği tozu oranı arttıkça pikin keskinliğinin arttığı ve en keskin piki %40 sübye kemiği içerikli biyo-greftin verdiği görülmektedir. Nano boyutta HA esaslı ve %20-30 oranları arasında sübye kemiği içerikli biyo-greftlerde ise, bunun tam tersi olduğu ve sübye kemiği miktarı azaldıkça pikin keskinliğinin arttığı gözlenmektedir. Mikron ve nano boyutta HA esaslı ve %20-40 oranlarında lületaşı tozu katkılı biyo-greftlerin FTIR karakterizasyon çalışmalarında, 1117.99-947.73 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ piki görülmekte olup, 1022.81 ve 1024.20 cm^{-1} de bu pik keskin bir şekilde gözlenmektedir. mikron ve nano boyutta HA esaslı ve %20-40 oranında yumurta kabuğu katkılı bütün biyo-greftlerde (IV. Grup), 1113.76-943.57 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ piki gözlenmekte olup, 1020.64 ve 1023.50 cm^{-1} de bu pik keskin bir şekilde görülmektedir. Ayrıca mikron boyutta HA ve %20-40 oranında yumurta kabuğu içerikli biyo-greftlerde 2916.91cm^{-1} pik şiddetinde $(CO_3)^{-2}$ bileşiğine bağlı olarak geniş ve şiddeti az pikler yer almaktadır. Bütün mikron ve nano boyutta HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu tozu katkılı alternatif biyo-greftler kıyaslandığında ise, biyo-greftlerin hepsinde HA ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu

içeriğine bağlı olarak PO_4^{-3} ve CO_3^{-2} pikleri görülmektedir. Bunun yanında nano boyutta HA içerikli biyo-greftlerde piklerin daha keskin ve dar olduğu görülmekte olup, mikron boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde görülen $(CO_3)^{-2}$ piklerinin nano boyutta HA kullanılarak üretilen biyo-greftlerde olmadığı gözlenmektedir. Ayrıca lületaşı ve sübye kemiği ilaveli biyo-greftlerle kıyaslandığında, farklı oranlarda yumurta kabuğu içerikli biyo-greftlerde, lületaşı ve sübye kemiği ilaveli biyo-greftlerde görülen istikrarlı pik şiddetleri görülmemektedir. Böylece lületaşı veya sübye kemiği miktarına miktarı arttıkça yada azaldıkça görülen pik şiddetindeki azalış veya artış, yumurta kabuğu ilaveli biyo-greftlerde görülmemektedir. IV. grupta poroz yapıya sahip HA, biyocam, sübye kemiği ve lületaşı esaslı biyo-greftlerde benzer pik aralıklarının elde edildiği belirlenmiştir. Böylece poroz yapıdaki bütün biyo-greftlerin FTIR sonuçlarında, 1136.16-570.21 cm^{-1} aralığında $(PO_4)^{-3}$ piki görülmekte olup, piklerin keskin olmayıp, geniş olduğu gözlenmektedir. Ayrıca %30-10 HA esaslı %20-75 jelatin içerikli (H30G20, H30G30, H30G40 ve H10G75 kodlu) biyo-greftlerde 2018.45 cm^{-1} pikinde OH^- bağına bağlı bileşiklerin oluştuğu tespit edilmiştir. Poroz yapıdaki lületaşı esaslı ve %20-75 oranında jelatin içerikli (L40G20, L40G30 ve L10G75 kodlu) biyo-greftlerin karakterizasyon çalışmalarında ise, diğer poroz yapıdaki biyo-greftlerden farklı olarak 2293.13 pik şiddetinde CO_3^{-2} piki görülmektedir.

Sol-jel yöntemiyle üretilen HA sentez biyo-greftleri ile HA esaslı biyo-greftlerin kimyasal yapıları XRD cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Yapılan inceleme sonucu, bütün biyo-greftlerde kalsiyum fosfat içerikli bileşiklerin oluştuğu belirlenmiştir. Aynı kompozisyonda farklı pH değerlerine sahip (pH=5, 7, 9, 12) N1-12, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu biyo-greftlerle yapılan XRD incelemeleri sonucu bütün biyo-greftlerde HA ve β-TCP fazlarının oluştuğu gözlenmektedir (Şekil 4.13). Ayrıca HA sentez biyo-greftlerinde pik pozisyonlarının değişmediği, fakat pH değeri yükseldikçe pik şiddetlerinin azaldığı belirlenmiştir. HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerin XRD analiz sonuçlarına göre, bütün biyo-greftlerde HA ve $Ca_3(PO_4)_2$ bileşiklerinin oluştuğu gözlenirken, farklı bileşiklerin oluştuğu da gözlenmiştir. Buna bağlı olarak, H60 kodlu biyo-greftte $Ca_4P_2O_9$, H30Ca kodlu biyo-grefte ise $Ca_2P_2O_7$ bileşiklerin oluştuğu XRD analiz sonuçlarında görülmektedir. III. ve IV. grupta ürettiğimiz kompakt ve poroz yapıda HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftler de HA ve β-TCP fazlarının oluştuğu gözlenirken, bu bileşiklerin oranlarına bağlı olarak pik şiddetlerinin değiştiği belirlenmiştir. Böylece III. grupta yer alan HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler de katkı malzemelerinin oranı arttıkça pikin daha düzenli ve kararlı olduğu, buna bağlı olarakta pik genişliğinin azalıp pik uzunluğunun arttığı gözlenmiştir. IV. grupta yer alan poroz yapıdaki biyo-greftlerde ise, bunun tam tersi olduğu ve jelatin miktarı arttıkça por oranı arttığı için pikin genişliğinin ve uzunluğunun düştüğü belirlenmiştir. Pikin genişliğinin ve uzunluğunun düşmesi biyo-greftin tane boyutunun ve kristalitesinin düşmesine neden olduğu gözlenmektedir.

FTIR ve XRD analiz sonuçları karşılaştırıldığında, HA sentez ve HA esaslı biyo-greftlerin XRD sonuçlarındaki HA ve β-TCP fazlarına ve FTIR analizinde PO_4^{-3} ve CO_3^{-2} piklerinin görülmesi bağlı olarak XRD ve FTIR sonuçlarının birbirini desteklediği gözlenmektedir.

Bütün biyo-greftlerin SEM-EDX sonuçları karşılaştırıldığında, biyo-greftlerin kimyasal içeriğine ve üretim yöntemine bağlı olarak farklı morfolojik ve kimyasal özellik sergilediği gözlenmiştir. I. gruptaki HA sentez (N1-12 kodlu) biyo-greftine NH_4OH ve fosforik asit ilave edilerek pH değerleri 5, 7, 9 yapılmış ve pH farkının HA üzerindeki etkileri incelenmiştir(Şekil 4.28-Şekil 4.35). Sonuçta; farklı pH (5, 7, 9, 12) değerlerine sahip HA sentez (N1-12, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu) biyo-greftlerinin morfolojik görüntülerinden, N1-5 kodlu biyo-greftin boşluksuz kompakt görüntüsünün tersine N1-12 (pH=12), N1-7 (pH=7) ve N1-9 (pH=9) kodlu biyo-greftlerin hepsinde taneler arası boşlukların oluştuğu ve bu boşluk miktarının pH değeri yükseldikçe azaldığı gözlenmektedir. pH değeri 5 olan HA sentez (N1-7-5 kodlu) biyo-greftinin boşluklara sahip olmayan ve sıvı faz sinterlenmesine bağlı olarak en kompakt görüntüyü verdiği görülmüştür. Ayrıca, bütün biyo-greftlerin tane boyutu ölçüldüğünde N1-7 kodlu biyo-greftin en yüksek tane boyutunu (4,822μm) verdiği ve pH değeri değiştirilen bütün biyo-greftlerin N1-12 kodlu biyo-grefte göre daha küçük tane boyutu verdiği gözlenmiştir. pH değerleri değiştirilen biyo-greftler kıyaslandığında, en küçük tane boyutunu da N1-9 kodlu biyo-greftin(0,682μm) ve en büyük tane boyutunun da N1-5 kodlu biyo-greftin (2,401μm) verdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.1). EDX sonuçlarına göre, farklı pH değerlerine sahip bütün HA sentez biyo-greftlerinin Ca, P ve O içerdiği ve pH değeri arttıkça Ca ve P miktarının düşüp, O miktarının arttığı gözlenmektedir. HA'e farklı bileşikler ekleyerek üretilen II. gruptaki HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftler de HA sentez biyo-greftlerinden daha iyi morfolojik görüntü elde edildiği Şekil 4.37- Şekil 4.41'de belirlenmiştir. H60 ve H50Y10 kodlu biyo-greftler de boşlukların olmadığı ve sıvı faz sinterlemesine bağlı kompakt bir görüntünün olduğu gözlenirken, H30Ca kodlu biyo-greftte daha küçük tane boyutuna sahip tanelerle birlikte taneler arası boşlukların oluştuğu gözlenmiştir. EDX sonuçlarına göre, HA esaslı bütün biyo-greftler Ca, P, K, Na ve O elementleri içerirken H50Y10 kodlu biyo-greftin farklı olarak Y elementini içerdiği belirlenmiştir. III. grupta yer alan mikron ve nano boyutta HA esaslı ve farklı oranlarda (%20, 30 ve 40) sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler de nano boyutta HA esaslı ve %30 sübye kemiği katkılı (N-H30S30 kodlu) biyo-greft hariç diğer bütün biyo-greftler de poroz yapının olmadığı ve sıvı faz sinterlemesiyle birlikte üniform bir tane dağılımına sahip bir morfolojik yapının oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.43-Şekil 4.47). N-H30S30 kodlu biyo-greftde ise, üniform bir tane ve boşluk dağılımına sahip olduğu görülmektedir. Nano ve mikron boyutta HA esaslı ve lületaşı katkılı biyo-greftlerde sübye kemiği tozu içerikli biyo-greftlerin tam tersinin oluştuğu ve N-H30L30 kodlu biyo-greft hariç diğer bütün biyo-greftler de üniform bir tane ve boşluk dağılımının oluştuğu gözlenmektedir. N-H30L30 kodlu biyo-greftte ise boşluksuz, sıvı faz sinterlemesinin oluştuğu

görülmektedir. Nano ve mikron boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftlerin morfolojik incelemeleri sonucuna göre, mikron boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler de poroz yapının görülmediği ve üniform bir tane dağılımının oluştuğu gözlenmektedir. Ayrıca bütün SEM görüntülerinden tanelerin keskin köşeli bir yapıya sahip olduğu ve yumurta kabuğu miktarı arttıkça bu keskinliğin azaldığı ve tanelerin küreselleştiği belirlenmiştir. Nano boyutta HA esaslı ve farklı oranlarda yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler de ise, tane sınırlarında düşük miktarda boşlukların olduğu üniform bir tane dağılımının oluştuğu ve yumurta kabuğu miktarı arttıkça boşlukların azaldığı gözlenmiştir. IV. grupta HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftlere farklı oranlarda (%20, 30, 40, 75) polimer (jelatin) ilave edilerek yüksek sıcaklıkta polimerin yapıdan uzaklaştırılıp bulunduğu bölgede boşlukların (porların) oluşması sağlanmıştır. Poroz yapıya sahip biyo-greftler üzerine yapılan incelemeler sonucu, bütün biyo-greftler de poroz yapının elde edildiği ve jelatin miktarı arttıkça por miktarının ve çapının arttığı gözlenmektedir. Böylece en düşük por miktarı %20 jelatin içerikli biyo-greftlerde görülürken en yüksek por miktarı da %75 jelatin içerikli biyo-greftlerde görülmektedir. Bütün bu sonuçlar, Bölüm 4.3.4.1 deki %porozite sonuçlarıyla desteklenmektedir. Böylece en yüksek por miktarını S13G75 kodlu biyo-greftin (%50.5) ve en düşük por miktarını da L40G20 kodlu biyo-greftin (%15.3) verdiği belirlenmiştir.

Kırılma anında kemik o ana kadar absorbe ettiği enerjiyi serbest bırakır. Hızı yüksek olan yüklenmelerde kırık parçalı olup yumuşak doku hasarı fazla olmaktadır. Yükleme hızına göre kırıklar düşük enerjili (ev kazaları), yüksek enerjili (trafik kazaları) ve çok yüksek enerjili (ateşli silahlar) olmak üzere üçe ayrılabilir. Etki eden gerilmeye göre ise çekme (kopma kırıkları), basma (Vertebra kırıkları), burulma (Femur kondil kırıkları) ve eğilme kırıkları (Tibia ve femur) olarak 4'e ayrılabilir. Kemiğin kırık sonrası remodelizasyonu greftin konup konmamasına göre değişiklik gösterir. Kırık sonrası fragmanlar arasında sadece aksiyal planda gelen kompresif yükler iletilir. Anatomik bütünlük bozulduğu için çekme, kesme ve eğilme yüklemelerini fragmanlar birbirine aktaramaz. Kırık kaynadıkça kemik ve greft arasında yük taşıma paylaşılır. Bu paylaşım kullanılan greftin elastisite modülüne ve geometrisine bağlı olarak değişir. Kırık kaynadıktan sonra fizyolojik yüklenmelere maruz kalan kemik eski biyomekanik özelliklerini zamanla tekrar kazanabilir [232].

Kemik dokusunun takip ettiği doğal iyileşme süreci, eğer basma kuvveti etkisi altındayken daha çabuk ve daha iyi iyileşme gösteriyorsa implant da düzgün bir şekilde baskı sağlayacak dizayna sahip olmalıdır [233]. Öte yandan eğer basma kuvveti yara iyileşmesi için zararlıysa tam tersi hareket etmek gerekebilir. Maalesef basma veya çekme kuvvetinin uzun kemik onarımı üzerindeki etkileri tam olarak anlaşılamamıştır [233]. Üstelik deneysel çalışmalar tamamen farklı bir sonuca varılabileceğini göstermektedir. Bunun yanında kemik gelişmesi ve kemik erimesi arasındaki denge in-vivo ortamda uygulanan statik ve dinamik kuvvetlere göre ayarlanabilir. Böylece bir başka deyişle daha fazla yük uygulanırsa, yüke karşı tepki olarak daha fazla osteojenik

(kemik gelişimi) aktivite oluşur. Tabi ki bu yük aktiviteyi artırmak yerine, hücrelere zarar verecek kadar aşırı olmamalıdır. Bu ilişki aynı zamanda kemiğin ve diğer dokuların piezoelektrik olgusuyla da alakalıdır. Kemik ve diğer dokulardaki basma zorlanması dengeyi bozacak elektrik potansiyellerinin artmasına yol açabilir. Ortopedik implantlar için dizayn prensipleri ve kriteri, dinamik yük taşıyıcı üyeler gerektiren diğer herhangi bir mühendislik uygulamasıyla aynıdır. Bir implantın tasarımında düşünülmesi gereken diğer faktörlerde eğilmeye karşı rijitlik ve çekme ve basma kırılmalarına karşı mukavemettir [233].

Lületaşı ve sübye kemiği ülkemizde bol miktarda bulunan doğal ürünler olup, maliyeti düşük, elde etmesi kolay ürünlerdir. Ayrıca sübye kemiği ve lületaşı, poroz yapıya sahip $CaCO_3$ ve $CaPO_4$ içeriğiyle kemiğin kimyasal yapısına benzer iyonlar içermektedir. Bunun dışında üretim sırasında katkı malzemesi olarak kullanılan lületaşı jelleşme özelliği yüksek ve ortam pH'nı nötr yapan doğal bir bileşiktir [254]. Sübye kemiği ise, kemiğe benzer mikroyapısı, kompozisyonu, kristalitesi, por boyutu ve biyouyumluluğu nedeniyle biyo-greft üretiminde kullanılan alternatif bir doğal üründür [255-257].

Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz biyo-greftlerin sertlik ve basma testleri altındaki biyomekanik deneyleri yapılarak, mekanik açıdan insan kemiğinin mukavemetine yakın biyo-greftlerin üretilip üretilmediği incelenmiştir. İnsan kemiğinin ana bileşen malzemesi olan HA'in basma dayanımı 294 MPa ve sertlik değeri 3.43 GPa (Vickers) olarak ölçülürken, insan kemiğinin basma dayanımı 159 MPa olarak belirtilmiştir[97, 236]. Yaptığımız çalışmada, I. gruptaki HA sentez (N1-12, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu) biyo-greftlerinin basma dayanımı değerleri 119- 38 MPa arasında ve sertlik değerleri de 7,51-2,39 GPa arasında değiştiği ve pH değeri düştükçe bu değerlerin azaldığı belirlenmiştir. Böylece en yüksek basma dayanımını (B.D.) ve sertliği (S) N1-12 kodlu (B.D.=119MPa, S=7,51GPa değerleriyle) biyo-greftin, en düşük basma dayanımı ve sertliği de N1-5 kodlu (B.D=38MPa, S= 2,39 GPa değerleriyle) biyo-greftin verdiği tespit edilmiştir. Ticari HA ile kıyaslandığında, ürettiğimiz HA sentez biyo-greftinin mukavemeti ticari HA'den düşük olduğu belirlenmiştir. HA'in kemiğin ana bileşen malzemesi olmasıyla birlikte kemiğin mekanik özelliklerinden düşük mukavemet değerleri vermektedir. Bu nedenle, yaptığımız çalışmada HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftler üretilerek mukavemet değerleri yükseltilmeye çalışılmıştır. HA esaslı biyo-greftlerin mekanik deneyleri sonucu HA sentez biyo-greftlerinden daha yüksek basma ve sertlik dayanımı değerleri (B.D.= 120-332 MPa ve S= 3,18-7,51GPa) verdiği gözlenmektedir. Böylece en yüksek basma ve sertlik dayanımını Yttria içerikli H50Y10 kodlu biyo-greftin (B.D=332MPa ve S= 7,51GPa) ve en düşük basma ve sertlik dayanımı değerlerini de H30Ca kodlu biyo-greftin verdiği (B.D=120 MPa, S=3,18GPa) belirlenmiştir. Böylece Yttria bileşiğinin HA'in mukavemet değerlerini yükselttiği gözlenirken, H30Ca kodlu biyo-greftin boşluklu yapıya sahip ve H50Y10 kodlu biyo-greftin boşluksuz ve üniform tane dağılımlı morfolojik görüntüsü bu biyo-greftlerin mukavemet sonuçlarını desteklemektedir.

Mikron ve nano boyutta HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı (III.Grup) biyo-greftlerin basma ve sertlik dayanımı karşılaştırıldığında, bütün biyo-greftlerin 151-170 MPa arasında basma dayanımı ve 2,96- 6,12 GPa sertlik değerleriyle birbirine yakın sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Yapılan basma deneyi sonucu, mikron ve nano boyutta HA esaslı %20, 30, 40 oranların da sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu tozu katkılı biyo-greftler arasında en yüksek basma gerilmesi değerini nano yapıda HA esaslı ve %20 oranında yumurta kabuğu katkılı biyo-greftin verdiği gözlenmektedir. Ayrıca bütün biyo-greftler 80-170 MPa arasında basma gerilmesi değeri verdiği belirtilmiştir. En düşük basma gerilmesi değerini de nano boyutta HA esaslı ve %30 oranında yumurta kabuğu katkılı biyo-greftin verdiği tespit edilmiştir. Mikron ve nano boyutta HA esaslı ve farklı oranlar da sübye kemiği ve lületaşı katkılı biyo-greftler de sübye kemiği ve lületaşı miktarı arttıkça basma gerilmesin değerinde çok büyük bir fark oluşmadığı ve basma gerilmesi değerlerinin ~170 MPa değerinde olduğu gözlenmektedir. Fakat mikron ve nano boyutta HA esaslı ve %20-40 oranların da yumurta kabuğu katkılı biyo-greftlerin farklı yumurta kabuğu oranlarında farklı basma gerilmesi değeri verdiği belirlenmiştir. Böylece nano boyutta HA esaslı ve %20-40 oranların da yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler de en yüksek basma gerilmesi değerini mikron boyutta HA esaslı ve %40 oranın da yumurta kabuğu katkılı biyo-greftin (190 MPa) ve 151 MPa basma gerilmesi değeriyle %20 yumurta kabuğu katkılı biyo-greftin verdiği görülmektedir. Mikron ve nano boyutta HA esaslı ve %20-40 oranların da yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler karşılaştırıldığında, mikron boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftlerin nano boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftlerden daha düşük basma gerilmesi değeri vermektedir. Ayrıca nano boyutta HA esaslı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler de yumurta kabuğu miktarı arttıkça basma gerilmesi değeri artmaktadır. Böylece en yüksek basma gerilmesini 190 MPa değeriyle %40 yumurta kabuğu tozu katkılı biyo-greftin verdiği gözlenirken, en düşük basma gerilmesini de 80 MPa değeriyle %20 yumurta kabuğu katkılı biyo-greftin verdiği görülmektedir.

Mikron ve nano boyutta HA esaslı ve mikron boyutta sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı (III.Grup) biyo-greftlerin sertlik dayanımı kıyaslandığında, bütün biyo-greftlerin farklı sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Böylece mikron boyutta HA esaslı biyo-greftlerin nano boyuta HA esaslı biyo-greftlerden daha yüksek sertlik değeri verdiği belirlenmiştir. Mikron boyutta HA esaslı sübye kemiği katkılı biyo-greftler de en yüksek sertlik değerini M-H30S40 kodlu biyo-greftin (6,87 GPa) ve en düşük sertlik değerini M-H30S20 kodlu biyo-greftin (6,12 GPa) verdiği görülmektedir. Nano boyutta HA esaslı ve sübye kemiği katkılı biyo-greftler de ise en yüksek sertlik değerini 6,31 GPa değeriyle N-H30S40 kodlu biyo-greftin ve en düşük sertliği de 4,75 GPa değeriyle N-H30S20 kodlu biyo-greftin verdiği gözlenmektedir. Lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler de ise, tam tersi olduğu ve mikron boyutta HA esaslı biyo-greftlerin nano boyuta HA esaslı biyo-greftlerden daha düşük sertlik değeri verdiği belirlenmiştir. Mikron boyutta HA esaslı

lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler de en yüksek sertlik değerini M-H30L40 ve M-H30Y20 kodlu biyo-greftlerin (5.24 ve 3,33 GPa) ve en düşük sertlik değerini de M-H30L30 ve M-H30Y40 kodlu biyo-greftlerin (2.80 ve 5,24 GPa) verdiği görülmektedir. Nano boyutta HA esaslı ve lületaşı ve yumurta kabuğu katkılı biyo-greftler de ise, en yüksek sertlik değerini 6,31 GPa değerleriyle N-H30Y40 ve NH30L40 kodlu biyo-greftlerin ve en düşük sertliği de 4,04 GPa değerleriyle N-H30L30 ve N-H30Y20 kodlu biyo-greftlerin verdiği gözlenmektedir.

Doku mühendisliği için tasarlanan sistemlerde dikkate alınması gereken bir parametre porozitedir. Kemikte hasarlı bölgedeki boşlukların gelişmekte olan yeni doku ile dolabilmesi için yapının o bölgeleri boşaltıp çıkabilmesine, yine gelişmekte olan dokuya gerekli besinlerin difüzyonuna ve hücreden kaynaklanan atıkların geçişine poroz yapı imkân verecektir. Bununla birlikte toplam porozite, por boyutu ve interkonnektivite de önemli değişkenlerdir. Sistemin kullanılacağı önemli özelliklerden diğer ikisi doku tipine uygun mekanik özelliklere sahip olması ve biyobozunur olmasıdır [55]. IV. grupda poroz yapıya sahip sübye kemiği, lületaşı, HA ve biyocam esaslı ve %20, 30, 40, 75 jelatin katkılı biyo-greftlerin basma gerilmesi ve sertlik değerleri poroz yapıda olmayan ve Zr ve Yt katkılı biyo-greftin basma ve sertlik değerleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan inceleme sonucu, en yüksek basma gerilmesi ve sertlik değerini poroz yapıya sahip olmayan HA esaslı ve Zr ile Yt içerikli biyo-greftin (B.G= 347 MPa ve S=9,53GPa) verdiği gözlenmektedir. Poroz yapıya sahip biyo-greftlerde ise, en yüksek basma gerilmesini lületaşı ve sübye kemiği tozu esaslı biyo-greftlerin verdiği gözlenirken, HA ve biyocam esaslı biyo-greftlerin birbirine yakın sonuçlar verdiği gözlenmektedir. Bütün poroz yapıya sahip biyo-greftler içerisinde en yüksek basma gerilmesini 400 MPa değeriyle L40G40 kodlu biyo-greftin ve en düşük basma gerilmesini de 42 MPa değeriyle H10G75 kodlu biyo-greftin verdiği belirlenmiştir. Poroz yapıya sahip biyo-greftlerin sertlik değerleri kıyaslandığında, HA ve lületaşı esaslı biyo-greftlerin en yüksek ve biyocam esaslı biyo-greftlerin ise en düşük sertlik değerlerini verdiği tespit edilmektedir. L40G20 kodlu biyo-greft 2,36 GPa değeriyle en yüksek sertlik değerini verirken, 0,43 GPa sertlik değeriyle B10G75 kodlu biyo-greftin en düşük sertlik değerini verdiği belirlenmektedir. Ayrıca bütün biyo-greftler de jelatin miktarı arttıkça sertlik değerinin düştüğü gözlenmektedir.

Medikal sistemlerin güncel kullanımında biyolojik performansını, biyouyumluluk ve toksit özelliklerini önceden belirlemek için bir dizi in vivo ve in vitro testler yapılır. Yapılacak uygulamada gelen yüklere ve kullanım yerine göre testlerin seçimi, anlamlı sonuçların bulunması ve optimum biyo-greft seçimi açısından önemlidir. Greftlerin implante etme metodlarının araştırma ve geliştirilmelerinde ve bu malzemelerin etkinlik ve güvenilirliklerinin belirlenmesinde biyomekanik ve in vivo biyouyumluluk çalışmaları çok önemli rol oynamaktadır [1]. Amaç, implante olan biyo-greftlerin in vivo biyouyumluluklarının sağlanması ve biyomekanik olarak

alternatif biyo-greftler üretmek ve kullanıma sunmaktır. Bu nedenle bütün biyo-greftlerin biyouyumluluğunu inceleyebilmek için in vivo ve in vitro testleri yapılmıştır. In vivo deneylerin de H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftler ticari greft ve kontrol grubuyla karşılaştırılarak benzerlikler ve farklılıklar belirlenmiştir.

Sol-jel yöntemiyle üretilen alternatif biyo-greftlerin biyouyumluluğunu incelemek amacıyla in vivo deneyleri yapılmaktadır. İn vivo deneylerinde ilk olarak defekt bölgesine biyomalzeme yerleştirilirken dokuya zarar gelir ve bir iltihap oluşur. Bunu yara iyileşme tepkisi takip eder. Eğer malzeme kısa bir süreliğine takılıp çıkarılırsa iyileşme normal bir şekilde gelişir. Ama eğer malzeme vücutta uzun süre kalırsa tepki değişir. Vücutta yabancı bir malzeme olduğundan normal doku iyileşmesi gerçekleşemez. Vücudun ilk reaksiyonu bu yabancı malzemeyi yok etmeye çalışmaktır. Fagositler gelirler ve normal görünen iltihap kronikleşir. Eğer fagositler tarafından yakalanabilir ve indirgenebilir bir malzeme değilse reaksiyon iki yoldan birini tercih edecektir. Bu her iki şekildeki iyileşme süreci boyunca genel tepki malzemenin çevresinde fibroz bir doku oluşturmaktır ki o malzemeyi vücudun kalan kısmından ayırsın. Fibroz kapsül ne kadar ince olursa malzeme o kadar biyouyumluluğa sahiptir. Daha nadir görülen bir tepki ise iltihabın kronik şekilde devam etmesi ve sonuçta dev hücreler veya granülüzasyonun oluşmasıdır. Bu durum malzeme biyouyumlu olmadığı zaman gerçekleşir ve konakçı doku hala onu nötralize etmeye çalıştığında görülür [56].

Yaptığımız çalışmada, H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin Yeni Zelenda tavşanları üzerinde delik (drill) oluşturularak in vivo deneyleri yapılmış ve biyouyumlu oldukları belirlenmiştir. Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA sentez (N1-7 kodlu) biyo-greftinin ticari greft ile benzer röntgen görüntüleri verdiği ve 60 günlük in vivo deneyi sonrası defektlerin tam olarak kapandığı, silikleştiği belirlenmiştir. Defektin doldurulmadan hazırlandığı kontrol grubunun kötü bir defekt görüntüsü verdiği, defektlerin tam olarak dolmadığı ve 60 gün sonunda kapanmadığı gözlenmiştir. HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftlerin N1-7 kodlu biyo-greften ve ticari greft ile kontrol grubundan daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. HA esaslı biyo-greftlerde ise 60 günlük in vivo deneyinde defektin daha kısa sürede kapandığı, silikleştiği belirlenmiştir.

İnflamasyon, herhangi bir damarlı dokunun doku yaralanmasına ilk cevabı olup inflamasyonun dört ana belirtisi vardır. Bunlar kızarıklık, şişlik, ısı artışı ve ağrıdır. Bu cevap hızlı ve normal bir cevaptır. Uzamışsa bir problem vardır. Yaralanma yerinde ilk olarak eritrositler gelirler daha sonra nötrofiller yaralanmadan sonraki 24 saat içinde görülürler ve 3-5 gün görülmeye devam ederler. Bu evre akut inflamasyon olarak adlandırılır. Yaralanma kaynağı ortadan kaldırılırsa cevap sonlanır ve doku normal görünüme döner. Eğer yaralanma kaynağı ortadan kaldırılmaz ve cevap devam ederse inflamasyon kronik inflamasyonun çeşitli evrelerine doğru

ilerler. Bu devam eden cevapta nötrofiller yerlerini monosit / makrofaj serisinden oluşan büyük hücrelere bırakır. Bu hücreler de fagositiktir ve geri kalan doku debrisini ve savunma maddelerini temizlemeye çalışır. Görevlerini yapamadıklarında bir araya gelerek büyürler ve multinükleer dev hücreleri oluştururlar. Bu kronik inflamasyonu oluşturur ve genellikle doku veya organa zarar veren büyük doku debris kitlesiyle ilişkilidir [214,215].

Deride veya mukoz membranlarda bir harabiyet olup bakteri girişi olduğunda enfeksiyon riski gelişir. Enfeksiyon varlığı inflamasyonun sonlanmasını önler ve kronik inflamatuar cevap gelişir. Bu durumda da yara iyileşmesi tamamlanamayacak ve yoğun skar dokusu gelişecektir. Yabancı cismin enfeksiyon üzerindeki etkisi şöyledir: Deri veya mukoz membranlar implantın iyileştirilmesine bağlı olarak hasara uğrarlar. Hasar ve yabancı cisim varlığı inflamatuar cevabı başlatır. Malzeme dokunun içindedir ve yara iyileşmesi etkilenecektir. Bakterinin varlığı da zaten var olan problemlere eklenecektir. Çok iyi bilindiği gibi yabancı cismin bulunması enfeksiyon riskini büyük oranda artıracaktır ve enfeksiyon oluşturmak için gereken bakteri sayısını düşürecektir. Sadece enfeksiyon riski artmakla kalmayıp bunu tedavi etmek de güçleşecektir [216]. Hidroksiapatitlerin insandan alınan lenfosit doku kültürü üzerindeki çalışmalarda inert olduğu görülmüş ve klinik çalışmalar için uygun bulunmuştur [216]. Hidroksiapatitin serum sıvısı içindeki davranışının incelendiğinde sıvının malzeme ile reaksiyona girmediği gözlenmiştir [207].

H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin Yeni Zelenda tavşanları üzerinde delik (drill) açılarak in vivo deneyleri yapılması sonrası histopatojik analizleri yapılmış ve defekt iyileşmesi üzerinde biyo-greftlerin etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak, in vivo deneyi yapılan bütün biyo-greftlerde operasyon sınırlarında genç granül dokularının (G.G.D.) ve osteositlerin oluştuğu gözlenirken, sadece H30Ca kodlu biyo-greft kullanılarak yapılan in vivo deneyi histopatoloji sonuçlarına göre biyo-greft kalıntılarının bulunduğu tespit edilmiştir. Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA esaslı (H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu) biyo-greftler karşılaştırıldığında, yoğun genç granül dokusu ve zengin osteosit yapısından dolayı en iyi sonucu H50Y10 kodlu biyogreften elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz HA sentez (N1-7 kodlu) biyogreftiyle, ticari greftin histopatolojik sonuçlarına göre, sınırlarda oluşan genç granül dokusuyla, yoğun osteositlerin oluşmasına bağlı olarak benzer histopatolojik sonuçlar gösterdiği söylenebilir. H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftlerin delme işlemiyle yapılan in vivo deneyi sonrası SEM-EDX analiz ile histopatolojik analiz sonuçları birbirini desteklemekte olup H60 kodlu biyo-greft hariç diğer bütün biyo-greftlerin defektleri doldurduğu ve kemik-greft arayüzeyinde yeni kemik oluşumunu sağladığı gözlenmektedir.

Kemiğin içinde ya da kenarında bulunan ve yeni kemikle dolması gereken kısımlar olarak tanımlanan kemik defektleri, kemik dokusunun kendini rejenere etme ve remodeling özelliğiyle iyileşmekle beraber, bazen travmayla veya konjenital olarak oluşmuş deformitelerin ve kemikteki

patolojilerin alınmasıyla ortaya çıkan geniş deformite sahalarının iyileştirilmesinde ve kemiğin iyileşmesine destek sağlamak amacıyla kemik greftleri ya da kemik yerine geçen malzemelerin kullanımı gerekmektedir[247,248]. İn vivo deneyinin ikinci aşamasında, kemiklerde boşluk (GAP) oluşturularak greftlerin boşlukların onarımı üzerinde etkileri incelenmiştir. Boşluk oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrasında bütün greftlerin röntgen görüntüleri kıyaslandığında, kemik onarımı için en iyi sonucu drill yönteminde olduğu gibi H30Ca ve H50Y10 kodlu alternatif biyo-greftlerin verdiği görülmektedir. Böylece sadece bütün biyo-greftlerin kontrol grubuna göre kemik onarımını hızlandırdığı ve ürettiğimiz HA esaslı biyo-greftlerin ise ticari greft ve N1-7 kodlu greftlerden daha iyi ve hızlı kemik onarımını sağladığı görüntülerden gözlenmektedir.

Boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası kemiklere üç nokta eğme testi uygulanarak kontrol grubu ve greft ile doldurulan kemiklerin mekanik özellikleri incelenmiştir. Yapılan üç nokta eğme testi sonucu, kemiklerin kısmi ya da tam olarak sünek davranış gösterdiği ve maksimum gerilme değeri arttıkça %Şekil Değişimi değerinin düştüğü belirlenmiştir. Eğme testi sonucu, en yüksek maksimum gerilme değerini ticari greft ile doldurulmuş kemik verirken, bunu kontrol grubu takip etmektedir. Ürettiğimiz biyo-greftler ticari-greft ve kontrol grubundan daha düşük maksimum gerilme değeri verirken daha yüksek %Şekil Değişimi değeri vermektedir. Buda ürettiğimiz biyo-greftlerin ticari greft ve kontrol grubundan daha sünek davranış gösterdiğini kanıtlamaktadır. Sol-jel yöntemiyle ürettiğimiz biyo-greftler kıyaslandığında, en düşük gerilmeyi HA sentez (N1-7 kodlu) biyo-greftinin verdiği gözlenirken en yüksek %Şekil Değişimi değerini N1-7 kodlu biyo-greftin verdiği belirlenmiştir. HA esaslı biyo-greftler arasında ise, en yüksek gerilmeyi H50Y10 kodlu biyo-greft vermekte olup, bu grefti H30Ca ve H60 kodlu biyo-greft ile doldurulan kemikler takip etmektedir(Tablo 4.12 ve Şekil 4.30-Şekil 4.160). Boşluk (GAP) oluşturularak yapılan in vivo deneyi sonrası yapılan eğme testin de kırık bölgelerinden alınan histopatoloji sonuçları, bütün kemiklerde canlı ve nekrotik dokuların birlikte olduğunu göstermektedir. En fazla nekrotik dokunun kontrol grubunun kırık bölgesinden elde edildiği, ticari greft ile N1-7 kodlu biyo-greftlerin kullanıldığı kemiklerin kırık bölgelerinde benzer histopatolojik yapının gözlendiği belirlenmiştir. Böylece ticari greft ve N1-7 kodlu biyo-greftte yoğun canlı dokuyla birlikte düşük miktarda cansız dokunun oluştuğu gözlenmektedir. HA esaslı biyo-greftlerin kullanıldığı kemiklerin eğme deneyi sonrası histopatolojik sonuçlarında yoğun ölü dokuya sahip H60 kodlu biyo-greftin en kötü sonucu verdiği ve fazla nekroz dokunun bulunmadığı H50Y10 kodlu biyo-greftin en iyi histopatoloji sonucu verdiği gözlenmektedir (Şekil 4.161). Ayrıca boşluk (GAP) açılarak yapılan in vivo deneyi öncesi ve sonrası ICP-MS analizi yapılarak elementer kayıp olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuçta; bütün biyo-greftlerin in vivo deneyi sonrası Ca element miktarında büyük artış gözlenirken diğer element miktarlarının (P, K, Na ve Y) değişken olduğu gözlenmektedir. H30Ca kodlu biyo-greftin in vivo deneyi sonrası Ca hariç bütün element miktarlarının (P, K ve Na) düştüğü belirlenmiştir. H60 kodlu biyo-greftte ise P elementi

miktarının düştüğü, Ca, Na ve K element miktarının arttığı tespit edilmiştir. Yttria bileşiğinin HA esaslı biyo-greftler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla ürettiğimiz H50Y10 kodlu biyo-greftin in vivo deneyi sonrası, Ca, K ve P element miktarının yükseldiği, Na element miktarının yüksek miktarda düştüğü ve Yttria element miktarının da düşük miktarda düştüğü gözlenmiştir. N1-7 kodlu biyo-greftin ise ICP-MS analizinde in vivo deneyi öncesi yapısında sadece Ca ve P elementlerinin olduğu görülürken in vivo deneyi sonrası yapısında K ve Na elementlerinin olduğu da gözlenmiştir. Ayrıca in vivo deneyi sonrası N1-7 kodlu biyo-greftin Ca element miktarının arttığı, P element miktarının düştüğü belirlenmiştir (Tablo 4.11).

Sol-jel yöntemiyle üretilen biyo-greftlerin farklı kültür ortamlarında (L929 ve osteoblast) toksik etkisini incelemek amacıyla in vitro (sitotoksisite) deneyleri yapılmıştır. Hücre kültür deneylerinde L929 tipi fare fibroblast hücreleri biyomalzeme yüzeylerine daha fazla oranda ve kolay bağlanabildiğinden, birçok biyomalzemenin biyouyumluluk testlerinde kullanılabilmekte ve tekrarlanabilir durumlarda kolay kültür edilebilir olduğundan dolayı tercih edilmektedir [209]. Osteoblast, kemik hücresinin öncülü olan olgunlaşmamış hücre çeşidi olup, çoğalarak, olgunlaşmamış kemik hücresine dönüşür. Böylece kemiklerin oluşumunda ve yenilenmesinde rol oynar. Bu nedenlerden dolayı L929 hücre kültürünü kullandığımız birinci deneyde H60, H30Ca, H50Y10 ve N1-7 kodlu biyo-greftler farklı konsantrasyonlar (0,1, 0,2, 0,3 µg/ml) ve 3 günlük deney sürecinde incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucu, 0,3 µg/ml konsantrasyon ile bütün biyo-greftlerin kültür büyümesi için miktar olarak fazla gelmesinden dolayı ilk günden itibaren hücre ölümünün olduğu gözlenirken, 0,1 ve 0,2 µg/ml konsantrasyonlar da 1. ve 2. gün hücre artışı olmuş bu artış 3. gün düşmüştür. Osteoblast hücre kültürleri kullanılarak yapılan in vitro incelemeleri HA sentez biyo-greftleriyle , HA esaslı biyo-greftler ve poroz yapıdaki HA, sübye kemiği, lületaşı ve biyocam esaslı biyo-greftler üzerinde yapılmıştır. sonuçta, HA sentez (N1-12, N1-5, N1-7 ve N1-9 kodlu) biyo-greftleriyle ticari greftin 0.1 ug/ml konsantrasyon ile yapılan 3 günlük sitotoksisite deneyleri sonrası pH değeri en düşük olan N1-5 kodlu biyo-greft hariç diğer bütün HA sentez (N1-12, N1-7 ve N1-9 kodlu) biyo-greftleriyle ticari greftin yüzde canlılık oranlarında artış olduğu gözlenmiştir. H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu biyo-greftler ile yapılan in vitro deneyi sonrası, 0.1 ug/ml konsantrasyonda yapılan sitotoksisite testlerin de H60 ve H50Y10 kodlu biyo-greftlerin konsantrasyon miktarı düşük olduğundan dolayı üç gün sonunda hücre canlılık oranının düştüğü görülürken, H30Ca kodlu biyo-greftte hücre canlılık oranının arttığı gözlenmiştir. 0.3 ug/ml konsantrasyon ile yapılan sitotoksisite testlerinde ise, H60, H30Ca ve H50Y10 kodlu bütün biyo-greftlerin üçüncü gün sonunda hücre canlılık oranının yükseldiği tespit edilmiştir. H40ZrYt kodlu biyo-greftin 0.1ug/ml konsantrasyon da yüzde canlılık oranının düşük miktarda arttırdığı gözlenirken, 0.3 ug/ml'lık yüksek konsantrasyon da yüzde canlılık oranını düşürdüğü, fakat değerin 100'ün altına düşmediği belirlenmiştir.

Poroz yapıya sahip biyo-greftler üzerine yapılan inceleme sonucu, H30G20 ve H10G75 kodlu biyo-greftlerin sitotoksisite deney sonuçlarına göre, her iki konsantrasyonda H30G20 ve H10G75 kodlu biyo-greftlerin hücre canlılık oranlarını arttırdığı gözlenmiştir. S30G20 kodlu biyo-greftin farklı konsantrasyonlarda ve farklı günlerde yapılan hücre ölçümleri sonucu; 0.1-0.3 µm/ml konsantrasyonlar da üçüncü gün sonunda hücre miktarının artış olduğu gözlenirken, S13G75 kodlu biyo-grefttin 0.1µm/ml konsantrasyonun da 3. gün sonunda hücre sayısında artış görülürken, 0.3µm/ml konsantrasyonda 3. gün sonunda hücre sayısında düşüş olduğu gözlenmektedir. Fakat S13G75 kodlu biyo-grefttin 0.3µm/ml konsantrasyonda yapılan sitotoksisite deneyleri sonucu 3. gün sonunda yüzde canlılık değerinin 100'ün altına düşmediği belirlenmiştir. L40G20 kodlu biyo-greftin 0.3ug/ml konsantrasyon da ilk günden itibaren hücre miktarını düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçta, L40G20 kodlu biyo-greftin 0.3ug/ml konsantrasyon ile toksik etkisi olduğunu göstermektedir. L10G75 kodlu biyo-greftin ise, 0.1ug/ml konsantrasyon da 3. gün sonunda yüzde canlılık oranını arttırdığı, fakat bu artışın 2. gün sonunda maksimum olduğu ve 3. gün düştüğü gözlenmiştir. L10G75 kodlu biyo-greftin 0.3ug/ml konsantrasyon da 3. gün sonunda hücre canlılık oranının net bir şekilde ve doğrusal olarak arttığı belirlenmiştir. B40G20 ve B10G75 kodlu biyo-greftlerin 0.1-0.3 µm/ml konsantrasyonlarda ve 1.-3. günlerde yapılan hücre ölçümleri sonucu; hücre miktarındaki istikrarlı artışa bağlı olarak toksik özellik göstermediği belirlenmiştir. Bütün biyo-greft ile yapılan sitotoksisite testleri sonucu (osteoblast hücreleriyle), N1-5 kodlu biyo-greftin asidik özelliğinden dolayı ve L40G20 kodlu biyo-greftin de 0,3 µg/ml'lik konsantrasyon miktarı fazla geldiğinden dolayı toksik etki göstermiş ve yüzde canlılık oranının düşmesine neden olmuştur. Bu iki biyo-greft dışındaki bütün biyo-greftlerin toksik etkisi olmadığı ve yüzde canlılık oranını arttırdıkları belirlenmiştir.

6. GENEL SONUÇLAR

Günümüzde insan yaşamını kolaylaştırmak, hastalıkların tedavisini hızlı ve tekrar gerektirmeyecek operasyonlarla yapabilmek amacıyla tıp sektörü ve buna bağlı olarak, bu tasarımlara gerekli malzemeler ile ilgili araştırma çalışmaları giderek artan yoğunlukta devam etmektedir. Her geçen gün, vücut ve dokularla daha uyumlu, insan kemiğine yakın biyomekanik davranışlar gösteren, daha uzun süre dayanabilen, daha ekonomik ve gerektiğinde de daha estetik görünüm taşıyabilen biyomalzemelerin keşif ve kullanım imkanı artmaktadır. İnsanların yaşam kalitesini arttırmaya yönelik olan bu çalışmalara doğal ürünler kullanılarak üretilen kemik biyo-greftlerinin katkısı da açıkça görülmektedir.

Yaptığımız çalışmada, HA sentez biyo-greftleri ile HA esaslı biyo-greftler üretilerek insan kemiğine yakın kimyasal, biyomekanik ve biyouyumluluk özelliği veren biyo-greftler üretilmeye çalışılmıştır. Sonuçta;

- Farklı pH değerlerine (5, 7, 9, 12) sahip HA sentez biyo-greftlerinin FTIR ve XRD sonuçlarından, HA ve β-TCP fazlarını içeren biyo-greftler üretildiği belirlenmiştir.
- Ürettiğimiz HA sentez biyo-greftlerinin basma ve sertlik dayanımının, pH değeri düştükçe HA'in basma ve sertlik dayanımına yakın olduğu gösterilmiştir.
- HA esaslı biyo-greftlerin FTIR analiz sonuçlarından $(PO_4)^{-3}$ ve $(CO_3)^{-2}$ pikleri verdiği gözlenirken, XRD sonuçlarından HA ve β-TCP fazlarının dışında $Ca_4P_2O_9$ ve $Ca_2P_2O_7$ bileşiklerini içerdiği de belirlenmiştir.
- Farklı pH değerlerine (5, 7, 9, 12) sahip HA sentez biyo-greftlerinin FTIR ve XRD sonuçlarından, HA ve β-TCP fazlarını içeren biyo-greftler üretildiği belirlenmiştir.
- HA sentez biyo-greftlerinin SEM görüntülerinden taneler arası boşlukların olduğu bir morfolojik yapı gözlenirken, pH değeri düştükçe porların azaldığı ve pH değeri 5 olan N1-5 kodlu biyo-greftin boşluksuz ve en kompakt yapıya sahip olduğu belirlenmiştir.
- H50Y10 kodlu biyo-greft de boşlukların olmadığı sıvı faz sinterlemesine bağlı kompakt bir görüntünün oluştuğu gözlenmiştir. Böylece morfolojik görüntülere bağlı olarak Yttria içerikli biyo-greftin HA esaslı biyo-greftler içerisinde en yüksek basma ve sertlik dayanımını verdiği tespit edilmiştir.
- HA esaslı biyo-greftlere CaO, P_2O_5, KH_2PO_4 ve Na_2CO_3'ın dışında sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu gibi katkı malzemelerinin % miktarı arttıkça biyo-greftlerin pik genişliğindeki azalmaya ve pik uzunluğundaki artışa bağlı olarak daha kristal bir yapıya sahip iri tanelerden oluştuğu belirlenmiştir.

- HA esaslı ve sübye kemiği, lületaşı ve yumurta kabuğu içerikli biyo-greftlerin basma dayanımlarının birbirine yakın olduğu, fakat en yüksek basma dayanımını nano boyutta HA esaslı ve %30 oranında yumurta kabuğu içerikli biyo-greftten elde edildiği gözlenmiştir.
- Poroz yapıya sahip HA, biyocam, sübye kemiği ve lületaşı esaslı biyo-greftlerde jelatin miktarı arttıkça %por (boşluk) miktarının arttığı gözlenmiştir.
- Poroz yapıya sahip HA, biyocam, sübye kemiği ve lületaşı esaslı ve jelatin içerikli biyo-greftlerde jelatin miktarı arttıkça tane boyutu ve kristalitesinin düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca por miktarı arttıkça basma ve sertlik dayanımının düştüğü gözlemlenmiştir.
- Ürettiğimiz HA sentez ve HA esaslı biyo-greftlerin 8 haftalık *in vivo* canlı hayvan çalışmaları sonucu, kemik defektlerinin iyileşmesini hızlandırdığı belirlenmiştir.
- Üretilen dolu (kompakt) HA esaslı biyo-greftler ve poroz yapıdaki (HA, sübye kemiği (cuttle fish), lületaşı ve biyocam esaslı) biyo-greftlerin osteoblast kemik hücreleriyle yapılan *in vitro* çalışmaları sonucu, 0,3 µg/ml konsantrasyonda N1-5 (asidik özelliğe sahip olduğu için) ve L40G20 kodlu biyo-greftler hariç diğer bütün biyo-greftlerin toksik özellik sergilemediği ve sitotoksisite deneyinde hücre oranında artış olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

[1] Özalp Y., Özdemir N., Biyomateryaller ve biyouyumluluk, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, (1993) 57-72.

[2] Tirrell M., Kokkoli E., The role of surface science in bioengineer materials, (2001).

[3] Lu J., Descamps M., Dejou J., Koubi G., Hardouin P., Lemaitre J., Proust J.P., The biodegratation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone, Biodegratation of calcium Phophate, (2002).

[4] Legeros R.Z., Lın S., Rohanizadeh R., Mijares D., Legeros J.P., Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications, J of Mater Sci: Mater in Med, 14 (2003) 201-209.

[5] Lu J.X., Flautre B., Anselme K., Hardouin P., Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 10 (1999)111-120.

[6] Temenoff J.S., Lu L., Mikos A.G., Bone tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds. In: Davies JE, editor, Bone Engineering. Toronto: EM Squared, (2000) 455–62.

[7] Bruder S.P., Caplan A.I.., Bone regeneration through cellular engineering. In: Lanza R.P., Langer R., Vacanti J., editors. Principles of tissue engineering,2nd ed. California: Academic Press, (2000) 683–96.

[8] Jones J.R., Boccaccini A.R.. ,Cellular ceramics in biomedical applications: tissue engineering. In: Scheffler M., Colombo P., editors. Cellular ceramics: structure, manufacturing, processing and applications, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Kga.A, (2005) 550–73.

[9] Freyman T.M., Yannas I.V., Gibson L.J., Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering, Prog. Mater. Sci., 46 (2001) 272–82.

[10] Hutmacher D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, Biomaterials, 21 (2000) 2529–43.

[11] Wilson J., Pigot G.H., Schoen F.J., Hench L.L., Toxicology and biocompatibility of bioglass, J . Biomed. Mater. Res., 15 (1981) 805–11.

[12] Oonishi H., Kutrshitani S., Yasukawa E., Iwaki H., Hench L.L., Wilson J., Tsuji E., Sugihara T., Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute, Clin. Orthop. Relat. Res., 334 (1997) 316–25.

[13] Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C., Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, J. Biomed. Mater. Res. Symp., 2(part 1) (1971) 117–41.

[14] Hench L.L., Paschall H.A.., Direct chemical bond of bioactive glass–ceramic materials to bone and muscle, J. Biomed. Mater. Res. Symp., 4 (1973) 25–42.

[15] Hench L.L., Paschall H.A.., Histochemical response at a biomaterial's interface. J. Biomed. Mater. Res. Symp., 5(part 1) (1974) 49–64.

[16] Gatti A.M., Valdre G.,Andersson O.H., Analysis of the in vivo reactions of a bioactive glass in soft and hard tissue, Biomaterials, 15 (1994) 208–12.

[17] Clark A.E., Hench L.L., Calcium phosphate formation on sol–gel derived bioactive glasses, J. Biomed. Mater. Res., 28 (1994) 693–8.

[18] Hench L.L., Sol–gel materials for bioceramic applications, Curr. Opin. Solid State Mater. Sci., 2 (1997) 604–10.

[19] Hench L.L., Wilson J., Surface-active biomaterials, Science, 226 (1984) 630–6.

[20] Chen Q.Z., Thompson I.D., Boccaccini A..R., 45S5 Bioglasss-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials, 27 (2006) 2414-2425.

[21] Gil-Albarova J., Salinas A.J., Bueno-Lozano A.L., Roma´n J.,Aldini-Nicolo N., Garcı´a-Barea A., Giavaresi G., Fini M., Giardino R., Vallet-Regı M., The in vivo behaviour of a sol–gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing, Biomaterials, 25 (2004) 4639-4645.

[22] Feng W., Mu-sen L., Yu-peng L., Yong-xin Q., A simple sol-gel tecnique for preparing hydroxyapatite nanopowders, Materials Letters, 59 (2005) 916-919.

[23] Bezzi G., Celotti B., Landi E., La Torretta T.M.G., Sopyan I., Tampieri A., A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation, Materials Chemistry and Physics, 78 (2003) 816-824.

[24] Fathi M.H., Hanifi A., Mortazavi V., Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowders, Journal of Materials Technology, 202 (2008) 536-542.

[25] Padmanaphan S. K., Balakrishnan A., Chu M.C., Lee Y.J., Kim T.N., Cho S.J., Sol-gel synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods, Particuology, 7 (2009) 466-470.

[26] Safranova T.V., Putlyaev V.I., Shekhirev M.A., Tretyakov Y.D., Kuznetsov A.V., Belyakov A.V., Densification additives for hydroxyapatite ceramics, Journal of the European Ceramic Society, 29 (2009) 1925-1932.

[27] Kim I.S., Kumta P.N., Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder, Materials Science and Engineering B, 111 (2004) 232-236.

[28] Wang D., Chen C., Liu X., Lei T., Effects of sol-gel processing parameters on the phases and microstructures of HA films, Colloids and Surfaces B, 57 (2007) 237-242.

[29] Cerrute M., Greenspan D., Powers K., Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5, Biomaterials, 26 (2005) 1665-1674.

[30] Liu J., Ye X., Wang H., Zhu M., Wang B., Yan H., The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method, Ceramics International, 29 (2003) 629–633.

[31] Zhang D., Hupa M., Hupa L., In situ pH within particle beds of bioactive glasses, Acta Biomaterialia, 4 (2008) 1498-1505.

[32] Kothapalli C., Wei M., Vasiliev A., Shaw M.T., Influence of temperature and concentration on the sintering behavior and mechanical properties of hydroxyapatite, Acta Materialia, 52 (2004) 5655-5663.

[33] Aoki H., Science and medical application of hydroxyapatite, JAAS, Tokyo, (1991).

[34] Hench L.L., Bioceramics: from concept to clinic, J.Am. Ceram. Soc., 74 (1991)1487-1510.

[35] Ravaglioli A., Krajewski A., Portu G., Problems involved in assessing mechanical behaviour of bioceramics, In Bioceramics, Proceedings of 1st International Bioceramics Symposium, ed. H. Oonishi, H. Aoki, K. Sawai, Ishiyaku EuroAmerica, Kyoto, Japan, 1 (1989) 13-18.

[36] Suchanek W., Yashima M., Kakihana M., Yoshimura M., Hydroxyapatite ceramics with selected sintering additives, Biomaterials, 18 (1997) 923-933.

[37] Kalita S.J., Bose S., Hosick H.L., Bandyopadhyyay A., CaO-P_2O_5-Na_2O-based sintering additives for hydroxyapatite (HAp) ceramics, 25 (2004) 2331-2339.

[38] Georgiou G., Knowles J.C., Glass reinforced hydroxyapapatite for hard tissue surgery-Part 1: mechanical properties, Biomaterials, 22 (2001), 2811-2815.

[39] Bernache-Assollant D., Ababou A., Champion E., Heughebaert M., Sintering of calcium phosphate hydroxyapatite Ca10(PO4)6(OH)2 I. Calcination and particle growth, Journal of the European Ceramics Society, 23 (2003) 229-241.

[40] Tancred D.C., Mccormack B.A.O., Carr A.J., A quantitative study of the sintering and mechanical properities of hydroxyapatite/phosphate glass composites, Biomaterials, 19 (1998) 1735-1743.

[41] Green D., Walsh D., Mann S., Oreffo R.O.C., The potantial of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons, Bone, 50 (2002) 253-9.

[42] Vago R., Plotquin D., Bunin A., Sinelnikov I., Atar D., Itzhak D., Hard tissue remodeling using biofabricated coralline biomaterials, J. Biochem. Biophys. Methodol, 50 (2002) 253-9.

[43] Sarıkaya M., Liu J., Aksay I. A., In: Sarıkaya M., Aksay I. A., editors, Nacre: properties, crystallography, and formation, Biomimetics: design and processing of materials, New York: american Institute of Physics, (1995) 34-90.

[44] Calvert P., Mann S., Review: synthetic and biological composites formed by in-situ precipitation, J. Mater. Sci., 23 (1988) 3801-6.

[45] Lowenstam HA, Weiner S. On biomineralization. Oxford: Oxford Univ. Press; (1989).

[46] J.H.G., Lemos A.F., Agathopoulos S., Valerio P., Kannan S., Oktar F.N., Ferreira J.M.F., Scaffolds for bone restoration from cuttlefish, Bone, 37 (2005) 850–857.

[47] İpekoğlu M., Gören Ş., İpek M., Gümüşpala S., Altıntaş S., Hidroksiapatit üretiminde farklı yöntemlerin karşılaştırılması, Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, BİYOMUT 2004, İstanbul - TÜRKİYE, (2004).

[48] Balazsi C., Weber F., Köver Z., Horvath E., Nemeth C., Preparation of calcium–phosphate bioceramics from natural resources, Journal of the European Ceramics Society,27 (2007) 1601-1606.

[49] Rocha J.H.G., Lemos A.F., Agathopoulos S., Kannan S., Valerio P., Ferreira J.M.F., Hydrothermal growty of hydroxyapatite scaffolds from aragonitic cuttlefish bones, Wiley Interscience, (2005).

[50] Kannan S., Rocha J.H.G., Agathopoulos S., Ferreira J.M.F., Fluorine-substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones, Acta Biomaterialia, 3 (2007) 243-249.

[51] Okumuş Z., Yıldırım Ö.S., The cuttlefish backbone: A new bone xenograft material?, Turk J. Vet. Anim. Sci., 29 (2005) 1177-1184.

[52] Veljovic Dj., Jancic-Hajneman R., Balac I., Jokic B., Putic S., Petrovic R., Janackovic Dj., The effect of The shape and size of the pores on the mechanical properties of porous HAP-based bioceramics, Ceramics International, 37 (2011) 471-479.

[53] Salman S., Gunduz O., Yilmaz S., Öveçoğlu M.L., Snyder R.L., Agathopoulos S., Oktar F.N., Sintering effect on mechanical properties of composites of natural hydroxyapatites and titanium, Ceramics International, 35 (2009) 2965-2971.

[54] Kalita S.J., Bose S., Hosick H.L., Bandyopadhyay A., $CaO-P_2O_5-Na_2O$-based sintering additives for hydroxyapatite (HAp) ceramics, Biomaterials, 25 (2004) 2331-2339.

[55] Akdemir Z.S., Doku Mühendisliğinde Kullanılacak Yeni Polimerik Biyomalzemelerin Geliştirilmesi, Marmara Üniversitesi Fen Bil. Ens. Kimya A.B.D. Organik Kimya Proğ. Doktora Tezi, (2009).

[56] Gökçek E.I., Ortopedik implant ve protez tasarımı için biyomalzemelerin mekanik özelliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Kara Elmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, (2006).

[57] Marks J.R.S.C., Odgren P.R., Structure of Development of The Skelaton. In Blezikian I.G., Rodan G.A., Editors Prenciples of Bone Biology. 2 nd. Ed. San Diego: Academic Press, (2002), 3-15.

[58] Beşkardeş I. G., Biyoseramik ve biyosinyal moleküllerle desteklenmiş poli(kaprolakton) doku iskeleleri: sentez, karakterizasyon ve mekanik doku mühendisliği uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2008).

[59] An Y. H., Draughn R. A ., Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface, CRC Pres, (2000)

[60] Kaplan F.S., Hayes W.C., Keaveny T.M., Boskey A., Einborn T.A., Iannotti J.P., Form and Function of Bone: In Simon S.R., Editor: Orthopaedic Basic Science. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, (1994) 128-84.

[61] Keaveny T.M., Morgan E.F., Niebur G.L., Yeh O.C., Biomechanics of Trabecular Bone, Annu Rev. Biomed. Eng., 3 (2001) 307-33.

[62] Cooper D.M., Matyas J.R., Katzenberg M.A., Halgrimsson B., Comparison of Microcomputed Tomographic and Microradyographic Measurement of Cortical Bone Porosity, Calcif. Tissue Int., (2004).

[63] Jenkins M., Biomedical Polymers CRC Pres., (2007).

[64] Karageorgiou V., Kaplan D., Review: Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis, Biomaterials, 26 (2005) 5474-5491.

[65] Liu X., Ma P.X., Phase Seperation, Pore Structure, and Properties of Nanofibrous Gelatin Scaffolds, Biomaterials, 30 (2009) 4094-4103

[66] Liu X., Smith L.A., Hu J., Ma P.X., Biomimetric Nanofibrous Gelatin/Apatite Composite Scaffolds For Bone Tissue Engineering, Biomaterials, 30 (2009) 2252-2258.

[67] Peter M., Binulal N.S., Nair S.V., Selvamurugan N., Tamura H., Jayakumar R., Novel Biodegradable Chitosan-Gelatin/ Nano-Bioactive Glass Ceramic Composite Scaffolds for Alveolar Bone Tissue Engineering, Chemical Engineering Journal, 158 (2010) 353-361.

[68] Xie E., Hu Y., Chen X., Bai X., Li D., Ren D., Zhang Z., In Vivo Bone Regeneration Using A Novel Porous Bioactive Composite, Applied Surface Science, 255 (2008) 545-547.

[69] Zhang Y.F., Cheng X.R., Chen Y., Shi B., Chen X.H., Xu D.X., Ke J., Three-Dimensional Nanohydroxiapatite/Chitosan Scaffolds As Potential Tissue Engineered Periodontal Tissue, J. Biomater. Appl., 21 (2007) 333-349.

[70] Zhao F., Grayson W.L., Ma T., Bunnell B., Lu W.W., Effects of Hydroxiapatite in 3D Chitosan-Gelatin Polymer Network on Human Mesenchymal Stem Cell Construct Development, Biomaterials, 27 (2006) 1859-1867.

[71] Manjubala I., Scheler S., Bossert J., Jandt K.D., Mineralisation of Chitosan Scaffolds With Nano-Apatite Formation By Double Diffusion Technique, Acta Biomater., 2 (2006) 75-84.

[72] Takahashi Y., Yamamoto M., Tabata Y., Osteogenic Differentation of Mesenchymal Stem Cell in Biodegradable Sponges Composed of Gelatin and , β-Tricalcium Phosphate, Biomaterials, 26 (2005) 3587-3596.

[73] Xu H.H., Simon C.G., Fast Setting CalciumPhosphate-Chitosan Scaffold: Mechanical Properties and Biocompatibility, Biomaterials, 26 (2005) 1337-1348.

[74] Jiankang H., Dichen L., Yaxiong L., Bo Y., Hanxiang Z., Qin L., Bingheng L., Yi L., Preparation of Chitosan-Gelatin Hybrid Scaffolds With Well-Organized Microstructures for Hepatic Tissue Engineering, Acta Biomater., 5 (2009) 453-461.

[75] Li Z., Ramay H.R., Hauch D.K., Xiao D., Zhang M., Chitosan-Alginate Hybrid Scaffolds for Bone Tissue Engineering, , Biomaterials, 26 (2005) 3919-3928.

[76] Zheng J.P., Wang C.Z., Wang X.X., Wang H.Y., Zhuang H., Yao K.D., Preparation of Biomimetric Three-Dimensional Gelatin/Montmorillonite-Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering, React. Func. Polym., 67 (2007) 780-788.

[77] Word A.G., Courts A., The Scince and Technology of Gelatin, Academic Press. London, (1977).

[78] Shie M.Y., Chen D.C.H., Wang C.Y., Chiang T.Y., Ding S.J., Immersion Behavior of Gelatin-Containing Calcium Phosphate Cement, Acta Biomater., 4 (2008) 646-655.

[79] Bigi A., Bracci B., Panzavolta S., Effect of Added Gelatin on The Properties of Chalcium Phosphate Cement, Biomaterials, 25 (2004) 2893-2899.

[80] Sivakumar M., Rao K.P., Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin From Coralline Hydroxiapatite-Gelatin Composite Microsphere, Biomaterials, 23 (2002) 3175-3181.

[81] Landi E., Valentini F., Tampieri A., Porous Hydroxiapatite/Gelatine Scaffolds With Ice-Designed Channel-Like Porosity For Biomedical Application, Acta Biomaterialia, 4 (2008) 1620-1626.

[82] Di-Silvio, L., Gurav, N. And Tsiridis. E. : „Tissue Engineering of Bone. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. Marcel Dekker Inc. 2 (2004).

[83] Tsiridis, E., Schizas, C. „Bone Fracture Fixation, Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering., Marcel Dekker Inc., 1 (2004).

[84] Puleo D.A., Bone-Implant Interface, Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering., Marcel Dekker Inc., 1 (2004).

[85] Park, Y. Joon, Hwang, Kyu-Seog, Growth of Calcium Phosphate On Poling Treated Ferro Electric $BaTiO_3$ Ceramics, Biomaterials,23 (2002) 3859-3864.

[86] Ergun, C. Elmas, N. Olacy, E., Biyoseramik Malzemelerin Özellikleri ve Uygulamaları 10. Denizli Malzeme Sempozyumu ve Sergisi, Denizli, (14-16 Nisan 2004).

[87] An Y. H., Draughn R. A . Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface, CRC Pres., (2000).

[88] Sikavitsas V.I., Temenoff J.S. and Mikos, A.G, Biomaterials and bone mechanotransduction, Biomaterials, 22 (2001) 2581-2593

[89] Özkoç, G.,Doku mühendisliği ve doku mühendisliği uygulamalarında biyomalzemeler, yapı iskeleleri ve biyoreaktörler, Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kurs Kitapçığı, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kocaeli, (2008).

[90] Beşkardeş I. G., Biyoseramik ve biyosinyal moleküllerle desteklenmiş poli(kaprolakton) doku iskeleleri: sentez, karakterizasyon ve mekanik doku mühendisliği uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2008).

[91] Doblare M., Garcia J.M and Gomez M.J, Modelling Bone Tissue Fracture and Healing: A review, Engineering Fracture Mechanics, 71 (2004) 1809-1840.

[92] Williams, D.F.. „Definitions in Biomaterials, Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986, Elsevier, New York, 4 (1987) 97.

[93] Aydoğdu MIK E., Sıçanlarda Vaskülarize Serbest Fibula Kemik Grefti Modelinde Kritik Venöz İskemi Süresinin Farklı Parametrelerle Değerlendirilmesi, T.C. SağlıkBakanlığı Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, (2005).

[94] Bostrom M., Yang X., Koutras I. Biologics in bone healing. Curr Opin Orthop. 11 (2000) 403-12.

[95] Öztuna, V., Biyomekanik, Mersin Üniversitesi, (2005).

[96] Jao-Young Rho., Mechanical Properties And The Hierarchical Structure Of Bone, 23 .

[97] Park, B. Joon and Lakes, S. Roderic, Biomaterials An Introduction, Plenum Press, New York, (1992).

[98] Mow, C. Van, Hayes, C. Wilson, Basic Orthapaedic Biomechanics, Raven Press, New York, (1991).

[99] Nordin, Margareta and Frankel, H. Victor, Basic Biomechanics of The Musculoskeletal System, Lippincott W & Wilkins, Philadelphia, (1989).

[100] Terrier A., Adaptation Of Bone To Mechanical Stress, Theoretical Model, Experimental Identification And Orthopedic Applications., Thesis, Swiss Federal Intitute Of Technology, (1999).

[101] Ege, R., Travmatoloji, Ankara, (1989) 360-380

[102] Evans, F. G., Mechanical Properties Of Bone, Charles, C., Thomas Pub, Springfied Illionious, USA, (1973).

[103] Atik, S., Yetkin, H., Kaymak, Ö., Ortopedi Ve Travmatoloji, Ankara, (1996) 84 .

[104] Yılmaz C., Kırık ve Çıkıkların Oluşum Mekanizması, Sınıflama, Bulgu ve Belirtileri, Mersin Üniversitesi.

[105] Strauch B., Vascanez L. Grabb's encylpoedia of flaps, second edition. Lipincott-Raven Publishers. Philadelphia-New York,(1998) 552.

[106] Mathes SJ.,Nahai F. Reconstructive Surgery. Principles, Anatomy&Technique. Churchill Livingstone Inc.(1997).

[107] Chen S.G., Xu X.Z., Zhang F., Free vascularized fibular bone flap in the rat. Microsurgery 20 (2000) 1-5.

[108] Williams D.F., On the mechanisms of biocompatibility, Biomaterials, 29 (2008) 2941-2953.

[109] Ratner B. D., Hoffman A.S., Schoen F. J and Lemons J. E, Biomaterials Science: A multidisciplinary Endeavor, Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Academic Press, Second Edition,(2004)

[110] Jenkins M., Biomedical Polymers CRC Pres, (2007).

[111] Gümüşderelioğlu M, Biyomalzemeler, Bilim ve Teknik, TÜBİTAK, 23 (Temmuz 2002 Sayısı) 2-4.

[112] Nair L.S., Laurencin C.T, Biodegradable polymers as biomaterials, Prog Poly Sci, 32 8-9 (2007) 762-798.

[113] Park, Y. Joon, Hwang, Kyu-Seog, Growth of Calcium Phosphate On Poling Treated Ferro Electric $BaTiO_3$ Ceramics, Biomaterials,23 (2002) 3859-3864.

[114] Ergun, C. Elmas, N. Olacy, E. Biyoseramik Malzemelerin Özellikleri ve Uygulamaları 10. Denizli Malzeme Sempozyumu ve Sergis, Denizli, (14-16 Nisan 2004).

[115] Park, B. Joon and Lakes, S. Roderic, Biomaterials An Introduction, Plenum Press, New York, (1992).

[116] Kay C, Dee, David, A. Puleo and Rena, Bizios, Tissue-Biomaterial Interactions, Wıley-Liss Inc. Pub., New York, (2002).

[117] Ayhan, H., Biyomalzemeler, Hacettepe Üniversitesi, Bilim Teknik Dergisi, 17 (2002).

[118] Akdogan, G., Ti-6Al-4V Alasımının Biyokorozyon ve Biyouymluluk Özelliklerinin Arastırılması, Gazi Üniversitesi, Ankara, (1998) 4-58.

[119] Ratner, B. D., Hoffman, A. G., Biomaterials Science, An Introduction To Materials İn Medicine, , San Diego, (1996).

[120] Hench, L.L., Splinter, R.J., Allen, W.C. ve Greenlee T.K., Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials, J. Biomed. Mater. Res., 2 (1971) 117-141.

[121] Hench, L.L., Bioceramics: From Concept to Clinic, J. Am. Ceram. Soc., 74 (1991) 1487-1510.

[122] Hench, L.L., Bioactive Materials: The Potential for Tissue Engineering, J. Biomed. Mater. Res., 41 (1998) 511-518.

[123] Park, B. Joon and Bornizo, D. Joseph, Biomaterials Principles and Applications, CRC Press, New York, (2003).

[124] Park, B. Joon and Lakes, S. Roderic, Biomaterials An Introduction, Plenum Press, New York, (1992).

[127] Feng Jianqing, Yuan Huipin and Zhang Xingdong Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic, Biomaterials, 18 (1997) 1531-1534.

[128] Park, Y. Joon, Hwang, Kyu-Seog Growth of Calcium Phosphate On Poling Treated Ferro Electric $BaTiO_3$ Ceramics, Biomaterials,23 (2002) 3859-3864.

[129] Smith, F. William, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği, Literatür Yayımcılık, İstanbul, (2001).

[130] Ergun, Celaletdin, Huinan Liu, Halloran, John W., Webster, Thomas J. Increased Osteoblast Adhesion On Nanograined Hydroxyapatite And Tricalcium Phosphate Containing Calcium Titanate, Wiley InterScience , DOI: 10.1002/jbm.a.30923, (2006).

[131] MARTIN R.B., Bone as a Ceramic Composite Material, Materials Science Forum, 293 (1999) 5-16.

[132] LIN, S., Ueng, S.W.N., Liu, S.C., Chan, E.C., Chao, E.K., Tsai, C.H., Chen, K.T., Wei, F.C., Shih, H. Development of a Biodegradable Antibiotic Delivery System, Clin. Orthop. Rel. Res., (1999).240-362.

[133]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 (2002) 858-861.

[134] (http://vefur.rf.is/TAFT2003/PPtskjol/Fyrirlestrar/L70%20-%20Kristberg.pdf)

[135] RAO, M.S., Kanat, S.R., Chander, R., Sharma, A., What Makes Radiation Processed Chitosan a Novel Food Preservative, Times Food Processing Journal, (Dec 2005-Jan 2006).

[136] QI, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X., Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles, Carbohydrate Research, 339 (2004) 2693-2700.

[137] PARHI, P., Ramanan, A., Ray, A.R., A Convenient Route for the Synthesis of Hydroxyapatite Through a Novel Microwave-mediated Metathesis Reaction, Materials Letter, 58 (2004) 3610-3612.

[138] MURUGAN, R., Ramakrishna, S., Development of Nanocomposites for Bone Grafting, Composites Science and Technology, 65 (2005) 2385-2406.

[139] (www.cnpbook.com/.../gallery/index.html Erişim tarihi: Aralık 2005).

[140] HOEPFNER, T.P., Case, E.D, Physical Characteristics of Sintered Hydroxyapatite, Bioceramics: Materials and Applications III, Ceramic Transactions,110 (2000) 53-54.

[141] XIAO, F., Ye, J., Wang, Y., Rao, P., Deagglomeration of During the Precipitation Synthesis, Journal of Materials Science, 40 (2005) 5439 – 5442.

[142] ERTE, E., Siyah Üzümde (Vitis vinifera L.) Bulunan Resveratrol'ün Üretim Veriminin Artırılmasına Ses Ötesi Dalgaların Etkisi, Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Tandoğan Yerleşkesi Kimya Mühendisliği Bölümü E Blok, Ankara, (2007).

[143] Halliday D., Resnick, R., Fiziğin Temelleri-1, (Çeviren: Prof. Dr. Cengiz Yalçın), 3. Baskı, (1992) 368-369.

[144] Thompson L.H., Doraiswamy, L.K., Sonochemistry: Science and Engineering Ind., Eng. Chem. Res. 38 (1999) 1215-1249.

[145] Tirrell, M., Kokkoli, E., The role of surface science in bioengineer materials, California, (2001).

[146] Bajpai, P.K., Ceramic Amino Acid Composites for Repairing Traumatized Hard Tissues. In: Handbook of Bioactive Ceramics, vol.II: Ca-P and HA Ceramics. Yamamuro, T., Hench, L.L., and Wilson-Hench, J., Eds., CRC Pres, Bato Raton, FL, (1990) 255-270.

[147] Yetkin, H., 2001. Ortopedi ve Travmatolojide Biomateryaller. 8th Biomedical Science and Technology Symposium (BİOMED8), IL02, METU Ankara/TURKEY, September 5-8, (2001).

[148] Bajpai, P.K., Fuchs, C.M., Development of a hydroxyapatite bone grout. In: proceedings of the firet annual scientific session of the academy of surgical research. San Antonio, Texas, Hall, C.W. Ed., Pergamon Pres, New York, NY, (1985) 50-54.

[149] Capello, W.N., D'Antonio, J.A., Finberg, J.R., Manley, M.T., 1997. HA-coated total hip femoral components in patients less than fifty years old., Jour. of Bone Joint Surg., 79A (1997) 1023-1029.

[150] Hayek, E., and Newesly, H., 1963. Pentacalciummonohydroxyorthoph., Inorg. Synth., 7-63 (1963).

[151] Taş A.C., Synthesis of Biomimetic Ca-Hydroxyapatite Powders at 37^{o}C in Synyhetic Body Fluids, Biomaterials, 21 (2000) 1429–1438.

[152] Tas, A.C., in situ Coating of Calcium Hydroxyapatite on Titanium or Stainless Steel Surfaces at 37°C in Synthetic Body Fluids, 4. Seramik Kongresi, Tebligler Kitabi, Eskisehir, 2 (22-25 Eylul 1998) 661-667.

[153] Oktar, F.N., Goller, G.,Heybeli, N., Varol, R., İnsan disi kullanılarak gozenekli biyoseramik uretimi, Deneysel Arastırma, 13-2 (2002) 99-104.

[154] Weng, W., and Baptista, J.L., A New Synthesis of Hydroxyapatite, Jour. of the European Ceramic Society, 17 (1997) 1151-1156.

[155] Tas A.C., Molten Salt Synthesis of Calcium Hydroxyapatite Whiskers. Jour. of Amer. Ceram. Soc., 84-2 (2001) 295-300.

[156] Piattelli, A., Trisi, P., Passi, P., Piattelli, M., and Cordioli G.P., 1994. Histochemical and confocal laser scanning microscopy study of the bone-titanium interface: an experimental study in rabbits. Biomaterials, 15-3 (1994) 194-200.

[157] Wise, D.L., 2000. Biomaterials and Bioengineering Handbook, Camridge Scientific, inc. Belmont, Massachusetts, (2000).

[158] Jordan, D.R., Mawn, L.A., Brownstein, S., McEachren, T.M., Gilberg, S.M., Hill, V., Grahovac, S.Z., Adenis, J.P., The bioceramic orbital implant: a new generation of porous implants, Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.,16-15 (2000) 347-355.

[159] http:// www.bioeye.com

[160] Park, B. Joon and Bornizo, D. Joseph, Biomaterials Principles and Applications, CRC Press, New York, (2003).

[161] Brown, W. Paul and Constantz, Brent, Hydroxyapatite and Related Materials, CRC Press, New York, (1994).

[162] Shackelford, J. F., Alexander, W., Park, J. S., Practical Handbook Of Materials Selection, (1995).

[163] Kay C, Dee, David, A. Puleo and Rena, Bizios, Tissue-Biomaterial Interactions, Wıley-Liss Inc. Pub., New York, (2002).

[164] Park, B. Joon and Lakes, S. Roderic, Biomaterials An Introduction, Plenum Press, New York (1992).

[165] Ergun, C. Elmas, N. Olacy, Biyoseramik Malzemelerin Özellikleri ve Uygulamaları 10. Denizli Malzeme Sempozyumu ve Sergis, Denizli, (14-16 Nisan 2004).

[166] Elgert, K. D., Understanding The Immun System, Immunology, Wiley-LPSS, New York, (1996).

[167] Hildebrand, H. F., Veron, C., Martin, P., Biocompatibility Of Co-Cr-Ni Alloys, New York, (1988).

[168] Enderle, J. D., Blanchard, M. S., Bronzino, D. J., Introduction To Biomedical Engineering.

[169] Martin, R. I., Brovon, P. W., Formation Of Hydroxyapatite In Serum, Journal Of Materials Science: Materials In Medicine, (1994).

[170] Akdogan, G., Ti-6Al-4V Alasımının Biyokorozyon ve Biyouymluluk Özelliklerinin Arastırılması, Gazi Üniversitesi, Ankara, (1998) 4-58.

[171] Hernandez, J. R., Keating, E. M., Faris, P. M., Meding, J. B., Ritter, M. A., Polyethylene Wear In Uncemented Acetabular Components, The Journal Of Bone And Joint Surgery, (1994).

[172] Ferguson, A. B., Laning, P. G., Hodge, E. S., Ionazition Of Metal İmplants In Living Tissues, J. Bone Joint Surgery, (1960).

[173] Scales, J. T., Roantre, B. M., Perry, R., Eboral, R., Ten Years Of Fixation Of Fractures, (1973).

[174] Williams, D. F., Corrosion Of _mplant Materials, Annu. Rev. Mater., (1976) 1-45.

[175] Meachim, G., Histological Interpretation Of Tissue Changes Adjacent To Orthopedic Implants, London, (1976).

[176] Hill, D., Wiley, J., Desing Engineering Of Biomaterials For Medical Devices, Biomaterials Science And Engineering Series, (1998).

[177] Enderle J.D., Blanchard M.S., Bronzino D.J., Introduction To Biomedical Engineering, (2005) 271.

[178] Chu C.C., Journal Of Biomedical Materials, (1982).

[179] Cottrell, H., The Mechanical Properties Of Materials, New York, (1964).

[180] Chu, C. C., Journal Of Biomedical Materials, (1982).

[181] Park, J. B., Biomaterials An Introduction, New York, (1979) 46-75.

[182] Hayden, W. G., Moffatt, W. G., Wullff, J., The Structure And Properties Of Materials, New York, (1965).

[183] Cottrell, H., The Mechanical Properties Of Materials, (1964), New York.

[184] Yılmaz, Y., Erzan, A., and Pekcan, Ö., Critical Exponents and Fractal dimension at the sol-gel phase transition via in-situ fluorescence experiments, Physical Review E., Part B, 6-58 (1998).

[185] Brinker, C.J., , Sol-gel Science, The Physics and Chemistry of Sol Gel Processing, Academic Press, San Diego, CA,(1990).

[186] Pierre, A.C., , Introduction to Sol-Gel Processing, Kluwer Academic Publishers, USA, (1998).

[187] Qiang W., Haizing Z. And Yuhong H., Direct patterning ITO transparent conductive coatings. Solar Energy Materials and Solar Cells, 68 3-4 (2001) 383-390.

[188] Livage J., Lemerle, J., Transition-Metal Oxide Gels and Colloids, Ann. REv. Mater Sci., 12 (1982) 103-122.

[189] Dislich H. And Hinz, P., History and Principies of The Sol-Gel Process, and Some New Multicomponent Oxide Coatings, J.Non-Cryst. Solids, 11(1982).

[190] Fkushima, J., Kodaira, K. and Matshushita, T., Preparation of Ferroelectic PZT Film by Thermal-Decomposition of Organametallic Compounds, J., Mar. Sci., 19 (1984) 595-598.

[191] Lipeles R.A. and Coleman, D.J., Ultrastructure Processing of Advanced Ceramics, Wiley, New York, (1988) 919.

[192] Strehleow, P., Schimidt, H., Berkhahn, M., Better Ceeramics Through Chemistry III, Mat. Res. Soc., Pittsburgh, Pa., (1988) 791.

[193]Reed S.T., and Ashley, C.S., Better Ceramics through Chemistry III, Mat. Res. Soc. Pittsburgh, PA, (1988).

[194] Evans, F. G., Mechanical Properties Of Bone, Charles, C., Thomas Pub, Springfied Illionious, USA, (1973).

[195] Wopenka, B., ve Pasteris, J.D., A mineralogical perspective on the apatite in bone, Materials Science and Engineering C, 25 (2005) 131-143.

[196] Clara, M. Magalhaes, F. ve Williams, P.A., Apatite Group Minerals: Solubility and Environmental Remediation, Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues, Ed: T.M. Letcher, Elsevier B.V., (2007).

[197] Panteix, P.J., Julien, I., Abelard, P. ve Bernache-Assollant, D., Influence of cationic vacancies on the ionic conductivity of hydroxyapatites, Journal of the European Ceramic Society 28 (2008) 821-828.

[198] Rey, C., Combey, C., Drouet, C., Sfihi, H. ve Barroug, A., Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials, Materials Science and Engineering C, 27 (2007) 198-205.

[199] Evis, Z., Al^{+3} doped nano hydroxyapatites and their sintering characteristics, Journal of the Ceramic Society of Japan, 114 (2006) 1001-1004

[200] Evis, Z., Reactions in hydroxylapatite–zirconia composites, Ceramics International, 33 (2007) 987-991.

[201] Evis, Z. ve Doremus, R.H., Hot-pressed hydroxylapatite/monoclinic zirconia composites with improved mechanical properties, Journal of Materials Science, 42 (2007) 2426-2431.

[202] Narasaraju, T.S.B. ve Phebe, D.E., Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite, Journal of Materials Science, 31(1996) 1-21.

[203] Evis Z., Çeşitli İyonlar Eklenmiş Nano-Hidroksiapatitler: Üretim Yöntemleri, İç Yapı, Mekanik ve Biyouyumluluk Özellikleri Yönlerinden İncelenmesi, International Journal of Research and Development, 3 (2011) 55-61.

[204] Sabah E., Çelik M.S., Sepiyolit, İnci Ofset, Afyon, (1998).

[205] Sabah E., Özdağ H., Çeşitli Amin Türleri Kullanılarak Sepiyolitin Adsorbsiyon Mekanizmasının Açıklanması, Osmangazi Üniv. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi, (1998).

[206] Murugan R, Rao KP., Controlled release of antibiotic from surface modified coralline hydroxyapatite. Trends Biomater Artif Organs,16 (2002) 43–5.

[207] Rocha J.H.G., Lemos A.F., Agathopoulos S., Valhrio P., Kannan S., Oktar F.N., et al. Scaffolds for bone restoration from cuttlefish, Bone,37 (2005) 850–7.

[208] Rivera E.M., Araiza M., Brostow W., Castano V.M., az-Estrada J.R., Hernandez R., et al. Synthesis of hydroxyapatite from eggshells, Mater Lett, 41 (1999) 128–34.

[209] Sanosh K.P., Chu M.C., Balakrishnan A., Kim T.N., Cho S.J., Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders, Mater Lett.,63 (2009) 2100–2.

[210] Singh B., Kumar Dubey A., Kumar S., Saha N., Basu B., Gupta R., In vitro Biocompatibility and Antimicrobial Activity of Wet Chemically Prepared $Ca_{10-x}Ag_x(PO_4)_6(OH)_2$ ($0.0 \leq x \leq 0.5$) Hydroxyapatites, Materials Science and Engineering C, 31 (2011) 1320-1329.

[211] Gür A.Kaya, Taşkın M., Metalik Biyomalzemeler ve Biyouyumluluk, Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, (2004).

[212] Gür A.K., Ni-Ti Alaşımı Bir Biyomalzemenin Üretimi ve İn-Vivo Şartlarda Biyouyumunun Araştırılması, Fırat Üniv. Fen Bil. Enst. Yüksek Lisans Tezi , Elazığ, (2004).

[213] Piermattei D.L., Flo G.L., An Atlas of Surgical Approaches to the Bones and Joints of the Dog and Cat, 299. Philadelphia: WB Saunders, (1993).

[214] Elgert K. D., Understanding The Immun System, Immunology, Wiley-LPSS, New York, (1996).

[215] Hildebrand, H. F., Veron, C., Martin, P., Biocompatibility Of Co-Cr-Ni Alloys, New York, (1988).

[216] Enderle, J. D., Blanchard, M. S., Bronzino, D. J., Introduction To Biomedical Engineering, (2005) 271.

[217] Martin, R. I., Brovon, P. W., Formation Of Hydroxyapatite In Serum, Journal Of Materials Science: Materials In Medicine, (1994).

[218] Banwart J.C., Asher M.A., HassaneinRS. Iliac Crest Bone Graft Harvest Donor Site Morbiditty: A Statistical Evaluation ., 20-9 (1995) 1055-1060

[219] Hadjipovlou A.G., Simmons J.W., Yang J., Nicodemus C.L., Esch O., Simmons D.J., Plaster of Paris As An Osteoconductive Material For Interbody Vertebral Fusion In Mature Sheep. Spine, 25-1 (2000):10-16.

[220] Younger E.M., Chapman M.W., Morbidity At Bone Graft Donor Sites. J orthop Trauma, 3-3(1989) 192-195.

[221] Blaha J.D., Evolving Technologies:New Answers or New Problems? Calcium Sulfate Bone-Void filler, Orthopedics, 21-9(1998) 1017-1019.

[222] Einhorn TA. Current Concepts Review: Enhancement of Fracture Healing. J Bone Joint Surg., 77(A) (1995) 940-956.

[223] Varlet A., Hingrez M., Osteogenetic Induction By Antibiotic Loaded Plaster of Paris Pellets Combined With Decalcified Bone Matrix, Rev. Chir. Orthop., 71-2 (1985) 73-78.

[224] Erdoğan F., İnsan ve Hayvan Kemiklerinden Elde Edilen Biyolojik Kaynaklı Hidroksiapatitin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Sentetik Hidroksiapatit ile Karşılaştırılması, İstanbul Üni, Cerrahpaşa Tıp Fak. Ortopedi ve Travmotoloji A.B.D. Uzmanlık Tezi, İstanbul, (1991)

[225] Chenglin C.,Jingchuan Z., Zhongda Y., Shidong W., Hydroxyapatite-Ti Functionaly Graded Biomaterial Fabricated by Powder Metallurgy, Materials Science And Engineering A, (1999), 95-10.

[226] Gu Y.W., Loh N.H., Khor K.A., Tor S.B., Cheang P., Spark Plasma Sintering of Hydroxyapatite Powders, Biomaterials, (2001), 37-43.

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

[228]Gerçek Beşkardeş I., Biyoseramik ve Biyosinyal Moleküllerle Desteklenmiş Poli(Kaprolakton) Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon ve Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2008) 113.

[229] Tığlı R.S., Investigation of Chitosan Scaffold Containing Bioreactor Performance for Cartilage Tissue Regeneration, Hacettepe Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, (2009).

[230] You L., Regenstein J.M., Liu R.H., Optimization of Hydrolysis Conditions for the Production of Antioxidant Peptides from Fish Gelatin Using Response Surface Methodology. J Food Sci, 75-6 (2010) 582-587.

[231] Us A.K., Kırıklar Hakkında Genel Bilgiler ve Tedavi İlkeleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, www.ortopedivetravmatoloji.us.

[232] Öztuna V., Biyomekanik, Mersin Üniversitesi, (2005).

[233] Park J. B., Biomaterials An Introduction, New York, (1979) 46-75.

[234] Güven Ş.Y., Ortopedik Malzemelerin Biyouyumlulukları ve Mekanik Özelliklerine Göre Seçimi, 2. Ulusal Tasarım İmalat ve Analiz Kongresi- Balıkesir, (11-12 Kasım 2010).

[235] Gümüşderelioğlu M., Tıbbın gelecegi biyomalzemeler, Bilim ve Teknik Dergisi, (2002) 2-4.

[236] Pasinli A., Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Biyomalzemeler, Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi, 4 (2004) 25-34.

[237](http://www.scribd.com/doc/25023282/Biyoseramik-Malzemeler-Ara%C5%9Ft%C4%B1rma (Erisim tarihi: 10.05.2010).

[238] Greenberg S.W., Gonzalez D., Gordjian E.S., Thomas L.M., Changes In Physical Properties Of Bone Between The In Vivo, Freshly Dead, And Embalmed Conditions. The Twelfth Stapp Car Crash Conference Proceedings, Society of Automotive engineers, New York, (1968) 271.

[239] Emes Y., Haznedaroğlu H., Yılmaz Y.Z., İpekoğlu M., Altıntaş S., Farklı Su Çıkartma (Dehidrasyon) Yöntemlerine Tabii Tutulmuş Kemiklerin Mekanik Özellikleri: Bir Ön Çalışma, Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, BİYOMUT 2004, İstanbul – TÜRKİYE, (2004).

[240] Doblare M., Garcia J.M and Gomez M.J; „Modelling Bone Tissue Fracture and Healing: A review" Engineering Fracture Mechanics, 71 (2004) 1809-1840.

[241] Beşkardeş I. G., Biyoseramik ve biyosinyal moleküllerle desteklenmiş poli(kaprolakton) doku iskeleleri: sentez, karakterizasyon ve mekanik doku mühendisliği uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2008).

[242] Sikavitsas V.I., Temenoff J.S. and Mikos, A.G, Biomaterials and bone mechanotransduction, Biomaterials , 22 (2001) 2581-2593.

[243] Ergun, C. Elmas, N. Olacy, E., Biyoseramik Malzemelerin Özellikleri ve Uygulamaları 10. Denizli Malzeme Sempozyumu ve Sergis, Denizli, 14-16 Nisan, (2004).

[244] Sikavitsas V.I., Temenoff J.S. and Mikos A.G, Biomaterials And Bone Mechanotransduction. Biomaterials, 22 (2001) 2581-2593.

[245] Tsiridis, E. Schizas, C., Bone Fracture Fixation. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Marcel Dekker Inc., 1(2004).

[246] Jenkins M., Biomedical Polymers CRC Pres., (2007).

[247] Aaboe M., Pinholt M.E., Hjorting-Hansen E, Healing of Experimentally Created Defects :A Review.Br. J. Oral Maxillofac. Surg., 33 (1995) 312.

[248] Bernard G.W., Healing And Repair of Osseous Defects, Dent, Clin, North Am.35-3 (1991) 469.

[249] Daştan M., Kitosan-Bazlı Biyomalzemelerde Biyofilm Oluşum Mekanizmasının ve Enzimatik Bozunma Kimetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2006).

[250] Akdemir Z.S. Doku Mühendisliğinde Kullanılacak Yeni Polimerik Malzemelerin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2009).

[251] E. Sabah, M.S. Çelik, Sepiyolit, İnci Ofset, Afyon, (1998).

[252] E. Sabah, H. Özdağ, Çeşitli Amin Türleri Kullanılarak Sepiyolitin Adsorbsiyon Mekanizmasının Açıklanması, Osmangazi Üniversitesi Fen Bil. Ens. Doktora Tezi, (1998).

[253] Y. Karabağlı, Yaralarda Pansuman Malzemesi Olarak Alfa Sepiyolit (Lületaşı)'in Kullanılması, Osmangazi Üniversitesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi A.B.D., Uzmanlık Tezi, (2002).

[254] Y. Karabağlı, Yaralarda Pansuman Malzemesi Olarak Alfa Sepiyolit (Lületaşı)'in Kullanılması, Osmangazi Üniversitesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi A.B.D., Uzmanlık Tezi, (2002).

[255] Manoli F, Dalas E. Calcium carbonate crystallization on xiphoid of the cuttlefish. J Cryst Growth, 217(2000) 422–8.

[256] Lowenstam HA, Weiner S. On biomineralization. Oxford: Oxford University Press; (1989).

[257] Bobyn J.D., Pilliar R.M., Cameron H.U., Weatherly G.C., The optimum pore size for the fixation of porous-surfaces metal implants by the in growth of bone. Clin Orthop Relat Res 150 (1980) 263–70.

[258] Jenkins M.; Biomedical Polymers CRC Press (2007).

[259] Montaser, A., Golightly, G.W., (Eds) 2nd ed, VCH, New York, (1992).
[260] Bouxsein M.L., Bone quality: where do we go from here?, Osteoporos Int, 14 - 5 (2003) 118-27.
[261] Bouxsein M.L., Biomechanics of age-related fractures. In:Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. Osteoporosis. Second Edition. San Diego: Academic Pres., 1 (2001) 509-31.
[262] Turner C.H., Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality, Osteoporos Int., 13 (2002) 97-104.
[263] Turner C.H, Burr D.B., Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial, Bone, 14 (1993) 595-608.
[264] Friedman A.W., Important determinants of bone strength.Beyond bone mineral density, J. Clin. Rheumatol., 12 (2006) 70-7.
[265] Bouxsein M.L., Determinants of skeletal fragility. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol, 19 (2005) 897-911.
[266] Mosekilde L., Iliac crest trabecular bone volume as predictor for vertebral compressive strength, ash density and trabecular bone volume in normal individuals, Bone, 9 (1988) 195-9.
[267] Keaveny T.M., Morgan E.F., et al. Biomechanics of trabecular bone, Annu. Rev. Biomed. Eng., 3 (2001) 307-33.
[268] Çal B., Gündüz O., Biyoseramiklerin kaplama yöntemlerinin karşılaştırılması, Yüzey İşlemleri, Ocak-Şubat 2010, 70 (2010) 12-26.
[269] Büyüksağiş A., 316L Paslanmaz Çelik ve Ti6Al4V Alaşımı Üzerine Sol Jel Yöntemi İle Hidroksiapatit (HAP) Kaplanması, Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi, 7-1 (2010) 1-11.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Elazığ'da doğdu. İlköğremini Elazığ Murat ilkokulu, Ortaöğrenimini Elazığ Ortaokulu, Lise öğrenimini 1999 yılında Elazığ Mehmet Akif Ersoy Lisesinde tamamladı. 2000 yılında girmiş olduğu Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümünü 2004 yılında bitirdi. 2004 yılında başladığı Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimini, 2007 yılında tamamladı. 2007 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Makine Eğitimi Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı. 2009 Yılında Adıyaman Üniversitesi'nde Öğretim Görevlisi olarak göreve başladı ve halen aynı Üniversitede çalışmaktadır.

Mehtap DEMİREL