

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

ALJİNAT MATRİSLİ MİNERAL KATKILI
HİDROKSİAPATİT İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ KEMİK
SKAFOLDLARI

Tezi Hazırlayan
İrem Nur ERKAN

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2025
NEVŞEHİR

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

ALJİNAT MATRİSLİ MİNERAL KATKILI
HİDROKSİAPATİT İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ KEMİK
SKAFOLDLARI

Tezi Hazırlayan
İrem Nur ERKAN

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2025

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra Koçak danışmanlığında İrem Nur ERKAN tarafından hazırlanan "**Aljinat Matrisli Mineral Katkılı Hidroksiapatit ile Zenginleştirilmiş Kemik Skafoldları**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Metalurji-Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.../.../20..

JÜRİ

Başkan : Prof. Dr. Bülent AKTAŞ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer KÜÇÜKDEVECİ

ONAY:

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

.../.../20..

Prof. Dr. Cemal ÇARBOĞA
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

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

(İmza)

(İrem Nur ERKAN)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda kişilik olarak da bana çok şey katan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK'a çok teşekkür ederim.

Tez sürecimde maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini hissettiren değerli aileme ve bu süreç boyunca beni motive edip her zaman yanımda olan sevgili nişanlım Ersel'e teşekkür ederim. Yüksek lisans boyunca beraber çalıştığımız canım çalışma arkadaşım Sümeyra Uslu'ya teşekkür ederim.

Doğal mikronize pomza numunesini bize sağlayan BC Teknoloji Danışmanlık ve İmalat firmasına (Kapadokya Teknopark, Nevşehir) teşekkür ederim. Ayrıca, biyoyumluluk testlerini iş birliği kapsamında Medical University of Lublin, Polonya'da gerçekleştiren Dr. Katarzyna Klimek'e teşekkür ederim.

Bu çalışmayı TEZ24F03 nolu projeye maddi olarak destekleyerek Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

ALJİNAT MATRİSLİ MİNERAL KATKILI HİDROKSİAPATİT İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ KEMİK SKAFOLDLARI

(Yüksek Lisans Tezi)

İrem Nur ERKAN

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

Haziran 2025

ÖZET

Doku mühendisliği ve yenileyici tıp alanında, hasar görmüş kemik dokularının onarım ve yenilenmesi uygulamaları için yenilikçi biyomimetik ve biyoaktif biyomalzemelere olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bu amaçla kullanılan biyomalzemeler arasında doğal polimer bazlı hidrojeller ve skafoldlar, biyoyumlu ve biyobozunur olmaları aynı zamanda hücre proliferasyonu ve doku bütünlüğünü destekleyici özellikleri sayesinde ön plana çıkmaktadır. Üretilen skafoldların hücrelerin tutunması, çoğalması ve kan akışı gibi yaşamsal devamlılığa uygun, gözenekli ve doğal kemik dokusuna benzer yapıda olması gereklidir. Kemiğin inorganik bileşiminde bulunan kalsiyum fosfat bileşiği olan hidroksiapatit (HA), biyoyumluluğu ve biyoaktif özellikleri nedeniyle kemik dokusunun onarımı ve yenilenmesi için dolgu malzemesi ve skafold olarak sıklıkla kullanılan biyoseramik bir malzemedir. Ancak sentetik olarak üretilen HA'nın yüksek kristalin stabiliteye sahip olması biyoçözünürlüğünü kısıtlayarak doku onarımının uzamasına neden olmaktadır. Bu nedenle HA'nın biyoçözünürlüğünü arttırıcı, doğal kemik yapısında yer alan iyonları içeren çeşitli iyon katkılı HA formları araştırılmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında uygun matris malzemesi olarak biyoyumlu yapısı, ekstraselüler matrise (ECM) benzer morfolojisi ve jel oluşturabilme yeteneği nedeniyle doğal bir polisakkarit olan aljinat (Alg) temelli hidrojel skafoldlar kemik yenilenmesi ve ilaç salınım uygulamaları için araştırılmıştır. Aljinat polimer matrisli skafoldlar hidroksiapatit temelli biyoseramikler ile katkılanmıştır. Hidroksiapatitin biyoçözünürlüğünü ve biyoaktivitesini arttırmak için içeriğinde zengin silikat iyonları içeren bir alümina silikat minerali doğal pomza (PM) minerali HA'nın içerisine katılarak skafold formlarında kullanılmıştır. %7,5 PM katkılı HA ve saf HA tozlarının

sentezi yapılarak 1100°C’de sinterlenmiştir. Sinterlenen biyoseramik tozları, *freeze-gelation* metoduyla aljinat polimer matrisi ile birleştirilerek çapraz bağlı poroz skafoldlar sentezlenmiştir. PM katkılı HA ile entegre edilmiş skafoldlara antibakteriyel ajan olarak Teikoplanin etken maddesini içeren Targocid ilacı entegre edilmiştir. Bu Teikoplanin yüklü Aljinat matrisli mineral katkılı skafoldlar aşamalı ilaç salınım mekanizmasıyla kemik rejenerasyonları ve tedavisi için antibakteriyel özellikte geliştirilmiştir. Geliştirilen kompozit skafoldlar; morfolojik, kimyasal, termal ve biyolojik (*in-vitro* şişme davranışı, biyoaktivite, antibakteriyel etkinlik ve biyouyumluluk) analizleri ile karakterize edilmiştir. Aljinat matrisli pomza katkısı yapılmış hidroksiapatit (Alg-HA-PM) skafoldlarda hücresel aktiviteleri destekleyici birbirlerine bağlı gözenek yapısı gözlemlenmiştir. Pomza ilavesi, HA’nın yüksek kristalin stabilitesini azaltarak yeniden mineralleşme yeteneğini arttırmıştır. Teikoplanin entegre edilmiş skafoldlar disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilen antibakteriyel testlerde gram negatif: *Escherichia coli* (*E.coli*) ve gram pozitif: *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) bakteri türlerine karşı antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Geliştirilen bu skafoldlar, yüksek biyoaktivite, uygun morfolojik yapı düşük sitotoksosite ve antibakteriyel etkinlikleri nedeniyle kemik enfeksiyonları tedavisinde ilaç salınımı gerçekleştirerek doku yenilenmesini teşvik edici uygulamalarda yüksek kullanım potansiyeline sahip olacağı öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: Aljinat, Biyomalzemeler, Doku Mühendisliği, Hidroksiapatit, Pomza.

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK
Sayfa Adeti: 92

**ALGINATE MATRIXED BONE SCAFFOLDS ENRICHED WITH MINERAL
DOPED HYDROXYAPATITE (M.Sc. Thesis)**

İrem Nur ERKAN

NEVSEHIR HACI BEKTAS VELI UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

June 2025

ABSTRACT

In the field of tissue engineering and regenerative medicine, the need for innovative biomimetic and bioactive biomaterials for repair and regeneration of damaged bone tissues is increasing. Among the biomaterials used for this purpose, natural polymer-based hydrogels and scaffolds stand out due to their biocompatibility and biodegradability as well as their properties supporting cell proliferation and tissue integrity. The produced scaffolds should be porous and have a structure similar to natural bone tissue which is suitable for vital continuity, such as cell adhesion, proliferation and blood flow. Hydroxyapatite (HA), a calcium phosphate compound found in the inorganic composition of bone, is a bioceramic material frequently used as a filler material and scaffold for repair and regeneration of bone tissue due to its biocompatibility and bioactive properties. However, the high crystalline stability of synthetically produced HA limits its biodegradability and causes tissue repair to be prolonged. Therefore, various ion-doped HA forms containing ions found in natural bone structure to increase the biodegradability of HA are being investigated.

Within the scope of this thesis study, hydrogel scaffolds based on alginate (Alg), a natural polysaccharide due to its biocompatible structure, extracellular matrix (ECM)-like morphology and gel-forming ability, were investigated for bone regeneration and drug delivery applications as a suitable matrix material. Alginate polymer matrix scaffolds were doped with hydroxyapatite-based bioceramics. In order to increase the biodegradability and bioactivity of hydroxyapatite, an alumina silicate mineral, natural pumice (PM) mineral containing rich silicate ions was doped into HA and used in scaffold forms. 7.5% PM-doped HA and pure HA powders were synthesized and sintered at

1100°C. Sintered bioceramic powders were combined with alginate polymer matrix by *freeze-gelation* method to synthesize cross-linked porous scaffolds. Targocid drug containing Teicoplanin active ingredient as an antibacterial agent was composed into scaffolds integrated with PM doped HA. These Teicoplanin loaded alginate matrix mineral doped scaffolds were developed with antibacterial properties for bone regeneration and treatments with a gradual drug release mechanism. The developed composite scaffolds were characterized by morphological, chemical, thermal and biological (*in-vitro* swelling behavior, bioactivity, antibacterial activity and biocompatibility) analyses. Interconnected porous structure supporting cellular activities was observed in alginate matrixed pumice doped hydroxyapatite (Alg-HA-PM) scaffolds. Pumice addition decreased the high crystalline stability of HA and increased its remineralization ability. Teicoplanin integrated scaffolds have shown antibacterial activity against gram negative: Escherichia coli (E. coli) and gram positive: Staphylococcus aureus (S. Aureus) bacterial species in antibacterial tests performed by disk diffusion method. These developed scaffolds are expected to have high potential for use in the applications promoting tissue regeneration by providing drug release in the treatments of bone infections due to their high bioactivity, suitable morphological structure, low cytotoxicity and antibacterial activity.

Keywords: Alginate, Biomaterials, Tissue Engineering, Hydroxyapatite, Pumice.

Thesis Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra KOÇAK

Page Number: 92

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xviii
1.BÖLÜM	1
GİRİŞ	1
2.BÖLÜM	6
LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	6
2.1. Kemiğin Yapısı ve Özellikleri	6
2.2. Kemik Çeşitleri.....	7
2.2.1. Kortikal (sıkı) kemik	7
2.2.2. Trabeküler (süngerimsi) kemik	8
2.3. Kemik Oluşumu (Ossifikasyon).....	8
2.3.1. İntramembranöz ossifikasyon	8
2.3.2. Endokondral ossifikasyon	9
2.4. Kemiğin Yeniden Şekillenmesi (Remodeling)	9
2.5. Doku Mühendisliği ve Biyomalzemeler.....	10
2.5.1. Biyomalzemelerin özellikleri	11
2.5.1.1. Biyouyumluluk.....	11

2.5.1.2.	Gözeneklilik	11
2.5.1.3.	Biyobozunurluk.....	11
2.5.1.4.	Biyoaktivite	12
2.5.2.	Biyomalzemelerin sınıflandırılması	12
2.5.2.1.	Metalik biyomalzemeler.....	12
2.5.2.2.	Polimerik biyomalzemeler	13
2.5.2.3.	Seramik biyomalzemeler.....	13
2.6.	Hidroksiapatit	14
2.6.1.	Hidroksiapatitin özellikleri.....	14
2.6.2.	Hidroksiapatitin kullanım alanları.....	15
2.6.3.	Hidroksiapatitin üretim yöntemleri	16
2.6.3.1.	Hidrotermal yöntem	17
2.6.3.2.	Kimyasal çöktürme yöntemi	17
2.6.3.3.	Sol-jel yöntemi.....	17
2.6.4.	Biyomimetik iyon değişimli hidroksiapatit.....	17
2.6.4.1.	Karbonat.....	18
2.6.4.2.	Magnezyum.....	18
2.6.4.3.	Florür.....	18
2.6.4.4.	Sitrat.....	19
2.6.4.5.	Silikat.....	19
2.7.	Pomza	19
2.7.1.	Pomzanın özellikleri.....	20
2.7.2.	Pomza çeşitleri	20
2.7.3.	Pomzanın kullanım alanları.....	21
2.7.4.	Pomzanın biyolojik alanda kullanımı	21

2.8.	Aljinat.....	22
2.8.1.	Aljinatın özellikleri.....	22
2.8.2.	Aljinatın kullanım alanları.....	24
2.8.3.	Aljinatın biyomedikal alanda kullanımı	24
2.9.	Hidrojeller	26
2.9.1.	Hidrojellerin sınıflandırılması.....	26
2.9.2.	Hidrojellerin ilaç salınımında kullanımı	28
2.10.	İlaç Yüklü Biyomalzeme Uygulamaları	29
2.11.	Teikoplanin.....	31
2.11.1.	Teikoplanin'nin kullanıldığı uygulamalar	33
3.BÖLÜM	36
MALZEME VE METOT	36
3.1.	Malzemeler.....	36
3.2.	Sol-Jel Yöntemi ile Hidroksiapatit Üretimi.....	36
3.3.	Sol-Jel Yöntemi ile Pomza Katkılı Hidroksiapatit Üretimi.....	37
3.4.	Aljinat Matrisli Kompozit Skafoldların Sentezi.....	38
3.5.	Aljinat Matrisli Kompozit Skafoldlara İlaç Yüklenmesi.....	39
3.6.	Karakterizasyon Çalışmaları	40
3.6.1.	XRD analizleri	40
3.6.2.	TGA/DTA analizleri	40
3.6.3.	SEM ve EDX analizleri.....	40
3.6.4.	FT-IR analizleri	41
3.6.5.	İlaç salınım çalışmaları	41
3.6.6.	Şişme (sıvı absorpsiyon) testi	41
3.6.7.	SBF (yapay vücut sıvısı) ortamında biyoaktivite testi	42
3.6.8.	Biyouyumluluk testleri.....	42

3.6.8.1. Biyomalzeme ekstraktlarının sitotoksitesi.....	42
3.6.8.2. Biyomalzemelerle doğrudan temas halinde hücre canlılığı	43
3.6.8.3. Biyomalzemelerle doğrudan temas halinde hücre çoğalması	43
3.6.8.4. İstatistiksel analizler.....	43
3.6.9. Antibakteriyel analizler	43
4.BÖLÜM	45
ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	45
4.1. Skafoldların Kimyasal Karakterizasyonları	45
4.1.1. FT-IR analizleri	45
4.1.2. XRD analizleri	47
4.1.3. EDX analizi.....	48
4.2. Morfolojik ve Yapısal Analizler	53
4.2.1. SEM analizi.....	53
4.3. Termal Analizler	56
4.3.1. TGA/DTA analizleri.....	56
4.4. Biyolojik Analizler	57
4.4.1. Aljinat matrisli kompozit skafoldların ilaç salınım çalışmaları	57
4.4.2. Şişme (su emme kapasitesi) testi	59
4.4.3. Biyoaktivite testleri	60
4.4.4. Biyouyumluluk ve sitotoksite testleri.....	65
4.4.4.1. Ekstraktların sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi.....	66
4.4.4.2. Biyomalzemeler üzerinde büyüyen hücrelerin canlılığı testi.....	66
4.4.4.3. Biyomalzemeler üzerinde büyüyen hücrelerin çoğalma testi	67
4.4.5. Antibakteriyel analizler	68
5.BÖLÜM	71
SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	71

KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ	92



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Deney numunelerinin isimleri ve uygulanan işlemler tablosu.....	38
Tablo 4.1.	Antibakteriyel test sonucu inhibisyon zon çapları.....	71



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Kemiğin hiyerarşik yapısı.....6
Şekil 2.2.	Kemiğin mikroskobik yapısı. 8
Şekil 2.3.	Hidroksiapatit kristal yapısı.14
Şekil 2.4.	HA'nın çeşitli ıslak sentez yöntemleri.16
Şekil 2.5.	Aljinat polimerindeki G bloğu, M bloğu ve G/M bloklarının kimyasal yapıları.....23
Şekil 2.6.	Teikoplanin'nin kimyasal yapısı..... 32
Şekil 3.1.	PM katkılı HA sentezine ait fotoğraflar: (a) Üç boyunlu reaktör içerisinde 70 °C'de karıştırılan solüsyonların reaksiyonu (b) filtrasyon ve yıkama işlemine ait görüntü, c. reaksiyon tamamlandıktan sonra gerçekleştirilen filtrasyon ve yıkama işlemleri sonrası elde edilip 100 °C'de 24 saat kurutulmuş örnek havanda öğütülürken görüntüsü..... 37
Şekil 3.2.	Alg-HA-PM skafoldların freeze-gelation yöntemi ile sentez aşamaları; (a) %7,5 PM katkılı HA (1100°C) seramik partikül dispersiyonuna Alg eklenerek karıştırılması (b) elde edilen Alg-HA-PM solüsyonu petri abı içerisinde (c) -20 C'de dondurma sonrasında ıslak formdaki hidrojel (d) Alg-HA-PM skafoldların dondurmaya kurutma sonrası poroz katı formu.....39
Şekil 4.1.	CI (Alg), CII (Alg+SC), CIII (Alg+HA), SI (Alg+HA+PM), SII (Alg+HA+PM+TEC) numunelerine ait ATR analiz spektrumları.....47
Şekil 4.2.	CIII (Alg+HA), SI (Alg+ HA+PM) ve SII (Alg+ HA+PM+TEC) numunelerinin XRD grafiği.....48
Şekil 4.3.	CI-Alg matrisli skafold (sodyum sitratsız) numunesine ait EDX analiz sonuçları: SEM 'de geri saçırma yoluyla elde edilen elektron mikroskop görüntüsü (sol-üst resim), renkli element haritasını (sağ-üst resim), kimyasal elementel analiz grafiği ve element bileşim tablosu (sol-alt resim).....49

Şekil 4.4.	CII-Alg matrisli skafold (sodyum sitratlı) numunesine ait EDX analiz sonuçları: SEM’de geri saçırma yoluyla elde edilen elektron mikroskop görüntüsü (sol-üst resim), renkli element haritasını (sağ-üst resim), kimyasal elementel analiz grafiği ve element bileşim tablosu (sol-alt resim).....	50
Şekil 4.5.	CIII (Alg + HA) skafold numunesine ait EDX analiz sonuçları.....	51
Şekil 4.6.	SI (Alg+HA+PM) numunesinin EDX analiz sonuçları.....	52
Şekil 4.7.	SII (Alg+ PM+ HA+ TEC) numunesinin EDX analiz sonuçları.....	53
Şekil 4.8.	Aljinat matrisli skafoldların SEM morfolojik analizleri: (a-b) CI (Alg) (c-d) CII (Alg+SC). Sağda numunelerin üst ve solda ise kesit görüntüleri verilmiştir (Görüntülerdeki ölçek çubukları 20µ uzunluktadır.....	54
Şekil 4.9.	Aljinat matrisli skafoldların SEM morfolojik analizleri: (a-b) CIII (Alg+HA) (c-d) SI (Alg+HA+PM) (e-f) SII (Alg+HA+PM+TEC) (Görüntülerdeki ölçek çubukları (a-c ve e). 20µ nm, (b-d ve f). 100 nm)..	55
Şekil 4.10.	CIII (Alg+HA) ve SI (Alg+HA+PM) numunelerine ait karşılaştırmalı a. TGA ve b. DTA eğrileri.....	56
Şekil 4.11.	280 nm dalga boyunda numunelerin absorbands ölçümleri ile elde edilen Teikoplanin etken maddesinin standart eğrisi.....	58
Şekil 4.12.	SII (Alg+HA+PM+TEC) numunesinden Teikoplaninin kümülatif salınımı.....	59
Şekil 4.13.	Hidrojel skafoldların (CI, CII, CIII, SI ve SII) farklı zaman aralıklarında (30 dakika ve 1, 2, 4, 6 ve 24 saat) şişme analizleri.....	60
Şekil 4.14.	Biyoaktivite test sonuçları, numunelerin (CI, CII, CIII, SI ve SII) SBF ortamında 7 güne kadar farklı zaman dilimlerinde (1, 4 ve 7 gün) inkübe edilmesiyle gerçekleştirilen biyomineralizasyonun araştırılması ile a. hidrojellerin kuru ağırlık oranının % 'sinin karşılaştırılması ve b. biyoaktivite testlerinin farklı zaman aralıklarındaki pH değişimlerinin karşılaştırılması.....	61

- Şekil 4.15. SBF ortamında 7 gün inkübasyondan sonra CI (a-c) ve CII (d-f) numunelerinin farklı ölçeklerdeki kesitlerinin SEM görüntüleri; (Görüntülerdeki ölçek çubukları (a ve d). 200 nm, (b ve e). 1 µm ve (c ve f). 20 µm).....62
- Şekil 4.16. SBF ortamında 7 gün inkübasyondan sonra CIII numunesinin farklı ölçeklerdeki kesitlerinin SEM görüntüleri; (görüntülerdeki ölçek çubukları: a. 200 µm, b. 1 µm ve c. 20 µm).....63
- Şekil 4.17. SBF ortamında 7 gün inkübasyondan sonra SI (a-c) ve SII (d-f) numunelerinin farklı ölçeklerdeki kesitlerinin SEM görüntüleri; (Görüntülerdeki ölçek çubukları (a ve d). 200 nm, (b ve e). 1 µm ve (c ve f). 20 µm).....64
- Şekil 4.18. Biyoaktivite testi yapılan CI, CII, CIII, SI ve SII numunelerinin karşılaştırmalı ATR spektroskopisi (a) SBF'de inkübasyondan önce (0. Gün) ve (b) SBF'de 7 günlük inkübasyondan sonra.....66
- Şekil 4.19. Aljinat bazlı biyomalzemelerden elde edilen sıvı özütlerle muameleden sonra normal insan fetal osteoblastının (hFOB 1.19 hücre hattı) canlılığı.....67
- Şekil 4.20. Aljinat bazlı skafoldlar üzerine yapışan normal insan fetal osteoblast hücrelerinin (hFOB 1.19 hücre hattı) canlılığı CLSM görüntüleri. (Polistiren üzerinde ekilen hücreler kontrol olarak kullanıldı. Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızı floresans yayar. Ölçek çubuklar 150 µm'dir).....68
- Şekil 4.21. Aljinat bazlı iskelelerde büyüyen normal insan fetal osteoblastının (hFOB 1.19 hücre hattı) proliferasyonunun kalitatif değerlendirmesi. Polistiren üzerinde kültürlenmiş hücreler kontrol hücreleri olarak kullanıldı. Hücreler 7 günlük inkübasyondan sonra Hoechst 33342 ve Alexa-Fluor Phalloidin 635 boya ile boyandı ve 200x büyütmede bir CLSM altında gözlemlendi. Hücre çekirdekleri mavi floresans yaydı, sitoskeleton ise kırmızı floresans yaydı. Çubuk ölçeği = 150 µm.....69

Şekil 4.22. E.coli (ATCC 25922) ve S.aureus (ATCC 25923) bakterileri ile test edilen (a) SI ve (b) SII numunelerinin inhibisyon zonlarını gösteren antibakteriyel test sonuçları.....70



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Alg	Aljinat
DTA	Diferansiyel termal analiz
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HA	Hidroksiapatit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PE	Polietilen
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PM	Pomza
PP	Polipropilen
PS	Polistrien
PU	Poliüretan
PVA	Polivinil alkol
PVC	Polivinilchlorür
PVP	Polivinilpirolidon
<i>S. Aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SBF	Yapay vücut sıvısı
SC	Sodyum sitrat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEC	Teikoplanin
TGA	Termogravimetrik analiz

TCP	Trikalsiyum fosfat
UV	Ultraviyole
XRD	X-ışını difraksiyonu
dk	Dakika
g	Gram
kV	Kilovatt
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
θ	Teta

1. BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

İnsan vücudunda zarar gören veya fonksiyonlarını kaybetmiş dokuların onarımı ve yenilenmesi için çeşitli tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler otogreft, allogreft ve xenogreft olmak üzere üç farklı şekilde gruplandırılır. Aynı kişiden alınan dokunun başka bölgeye nakledilme uygulamasına otogreft, iki farklı kişi arasında gerçekleştirilen doku nakline allogreft ve farklı türler arasında gerçekleştirilen doku nakline ise xenogreft denilmektedir (İnan ve Göktürk, 2011). Yöntemlerin avantajlarına rağmen doku uyuşmaması, enfeksiyon riski, donör bulma sıkıntısı ve cerrahi işlem gerekliliği gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinde görülen olumsuzlukları ortadan kaldırmak amacıyla yenilikçi biyomalzemelere duyulan gereksinim giderek artmaktadır. Son zamanlarda geliştirilen biyomalzemeler morfoloji, yapı, bileşim ve dayanım yönünden doğal dokuya benzer (biyomimetik), doku ile biyouyumlu ve işlevselliği yüksek fonksiyonel malzemeler olarak tasarlanıp uygulanabilmektedir. Kemik dokusu, kolajen temelli organik bileşenler ile inorganik apatit mineralleri ve su bileşenlerinden oluşan bir dizilime sahip kompozit bir yapıdadır. Kemikler, içerisinde kan akışı ve metabolik faaliyetler gibi yaşamsal aktivitelerin devam etmesine olanak sağlayan birbirleriyle bağlantılı çeşitli boyutlarda porlar içermektedir (Dorozhkin, 2011). Kemik dokusu hayat boyu kendini yenileyerek iyileşme yeteneğine sahiptir. Fakat yüksek boyutta kemik hasarlarının iyileşmesi için gerçekleştirilen klinik tedaviler başarısız olabilmekte ya da tehlikeli sonuçlara neden olabilmektedir. Yenileyici tıp alanında hücre, ilaç, büyüme faktörü vb. biyoaktif ajanlardan yardım alınarak üç boyutlu katı veya poroz yapılarda ya da enjekte edilebilir formlarda skafoldlar üretilebilmektedir. Bu sayede skafoldlar yalnızca fiziksel ve mekanik bir destek olmanın yanında hücre aktivitelerini yöneterek, ekstra-sellüler matris (ECM) üretimini sağlayabilmektedir. Dolayısıyla, biyoaktif ve biyobozunur skafoldlar doğal dokunun yenilenmesini teşvik etmesinin yanında biyolojik olarak bozunarak zamanla vücuttan atılabilme potansiyeline sahiptir (Holzwarth ve Ma, 2011).

Biyouyumlu ve biyobozunur polimer matris içerisine biyoseramiklerin entegre edildiği kompozit skafoldlar biyomimetik özellikleri sayesinde kemik yenilenmesi ve onarımında

umut verici biyomalzemelerdir. Doğal polimerler arasından aljinat (Alg), deniz yosunlarında ve toprak bakterilerinde yer alan guluronik asit ve manuronik asit içeren lineer kopolimer bir polisakkarittir (Draget ve Taylor, 2011). Aljinat, doğal ECM yapısına benzer içeriği ve morfolojisi, biyouyumlu oluşu, kolay elde edilebilir olması ve çapraz bağlı hidrojel oluşturma özellikleri nedeniyle çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Aljinat matrisli kalsiyum fosfat temelli kemik çimentosu formlarının *in-vitro* mineralizasyonu tetiklediği görülmüştür. Ayrıca, *in-vivo* deneylerde biyobozunma göstererek iyi bir osteointegrasyon sağlamış ve yeni kemik oluşumuna neden olmuştur (Cardoso vd., 2014).

Hidroksiapatit (HA), kemiğin temel bileşiminde yer alan bir kalsiyum fosfat bileşiğidir. Biyoaktif özellikleri sayesinde kemik doku onarımı ve yenilenmesinde oldukça önemli bir yeri vardır. Biyolojik olarak, kemik hücresi oluşumunu sağlayıcı osteoindüksiyon, biyoaktif bağlanma özelliği sayesinde osteokondüktif ve yeni kemik oluşumunu teşvik ederek kemiklerin hızlı bir şekilde iyileşmesine destek olmaktadır (Kumar vd., 2015). Bu nedenle, hidroksiapatit kemik dolgu malzemesi, implant kaplaması ve ilaç salımı gibi geniş bir alanda biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Ancak sentetik üretilen hidroksiapatitin oldukça yüksek kristalin kararlılığa sahip olması, vücuttaki çözünürlüğünü kısıtlamakta ve bu sebeple biyoaktif özelliği ve kemik yenilenmesindeki yeteneğini düşürmektedir. Kemiğin inorganik kısmını oluşturan biyolojik apatit SiO_4^{4-} , CO_3^{2-} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , F^- ve Cl^- gibi pek çok eser miktarda iyon katkısı içermektedir (Kannan vd., 2006). Bu iyonlar çeşitli biyolojik fonksiyonlarının yanında hidroksiapatitin kristal yapısı, termal davranışı ve biyolojik olarak çözünürlüğü gibi birçok fonksiyonu etkilemektedir (Juhász ve Best, 2012). Bu nedenle kemik onarımı ve yenilenmesinde hidroksiapatitin farklı iyon katkıları ile üretimi konusunda çalışmalar bulunmaktadır (Bang vd., 2014; Landi vd., 2006). Silisyum iyonu kemik mineral dengesi ve iskelet sağlığı konusunda önemli elementlerden bir tanesidir. İnsan vücudunda silisyum birçok dokuda çeşitli oranlarda bulunmaktadır. Silisyumu yapısında bulunduran silikat anyonu (SiO_4^{4-}) hidroksiapatitin kristal yapısında bulunan fosfat (PO_4^{3-}) iyonu ile yer değiştirerek apatitin tane boyutunu azaltarak çözünürlüğünü ve bağ dokuların (kemik ve kıkırdak gibi) dayanımlarını arttırmaktadır (Pietak vd., 2007). Yapılan araştırmalarda silisyumun osteoblastların büyümesini ve farklılaşmasını sağlamasının yanında alkalik fosfat ve osteokalsin etkinliğini artırarak kemik oluşumunu hızlandırdığı bildirilmektedir (Reffitt

vd., 2003). Yüksek miktarda silisyum içeren biyocamların ve polimer kompozit yapıların osteojenez sürecine ve kolajen üretimine katkı sağladığı bildirilmektedir (Lu vd., 2003). Ayrıca silikat içerikli Ca-Si ya da Ca-Mg-Si temelli biyoseramiklerin kemik doku mühendisliği uygulamalarında osteojenik özelliklerin yanında kemik yenilenmesinde hayati öneme sahip olan angiyoenez prosesini yani var olan damarlardan yeni kan damar ağları oluşumunu teşvik ettiği yönünde bazı literatür çalışmaları bulunmaktadır (Li ve Chang, 2013; Xia vd., 2016; Zhai vd., 2012).

Pomza (PM), volkanik faaliyetler sırasında püsküren lavların hızlı soğumasıyla oluşan doğal bir mineraldir. Silikatça zengin bir alüminasilikat bileşiği olan pomza, hafif ve poroz yapıya sahiptir. Kimyasal yapısında %60-75 civarında silikat ve %13-17 civarında alümina ve eser miktarlarda diğer element oksitlerinden; sodyum, potasyum, magnezyum, demir, kalsiyum gibi iyon katkılarını bulundurmaktadır (Li vd., 2010). Geniş yüzey alanı ve gözenekli yapısı sayesinde yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Pomza kolay elde edilebilir ve ekonomik olması nedeniyle inşaat, tarım, tekstil ve kimya gibi farklı sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, pomza biyoyumlu olması, toksik olmaması ve yüksek adsorpsiyon kapasitesinden dolayı biyoteknolojik uygulamalarda kullanım potansiyeline sahiptir. Pomza minerali özellikle yüksek sertliği ve poroz yapısı ile kemiğe benzer morfolojik ve biyomimetik element içeriği sayesinde özellikle kemik onarımı ve yenilenmesinde potansiyeli yüksek olan bir malzeme olarak düşünülmektedir.

Sitrat, %80 oranında kemiğin yapısında depolanır ve kemiğin organik fazının içerisinde yaklaşık %1-5 oranında bulunmaktadır. Kemik yenilenmesinde ve vücuttaki metabolik işlevlerin düzenlenmesinde sitratın önemli bir yeri vardır. Kemik yenilenmesinde sitratın görevleri şunlardır; kalsiyum ve fosfatın birikme hızını azaltır, HA kristallerinin çekirdeklenme prosesini destekler ve hidroksiapatit kristallerine kuvvetli bir şekilde bağlanarak kristallerin büyümesini kısıtlar. Sitrat sayesinde yeterli büyüklükte ve kararlı HA kristalleri elde edilerek kemik dokusunun oluşumuna katkıda bulunulur. Kısacası sitrat kemiğin kararlılığı, dayanıklılığı ve kırılma direnci gibi mekanik özelliklerinin korunması için hidroksiapatitin önemli bir parçasıdır (Liu vd., 2024; Ruiz-Agudo vd., 2021; D Sun vd., 2014).

Bu çalışmada hidroksiapatitin biyoçözünürlüğü güçlendirilerek kemik yenilenme hızını arttırmak için yüksek oranda silikat içerikli pomza minerali hidroksiapatite katkı olarak kullanılmıştır. Sol-jel yöntemi ile biyomimetik hidroksiapatitin üretimi sırasında doğal mikronize pomza ilave edilerek 1100°C’de sinterleme işlemi sonrası üretilerek karakterize edilmiştir. Bu sayede PM katkılı üretilen HA’nın yüksek stabilitesi düşürülerek yüksek biyoçözünürlük ve biyoaktiviteye sahip yeniden mineralleşme oranı yüksek apatit yapıları oluşturmak amaçlanmıştır. Üretilen saf ve PM katkılı HA biyoseramik tozları suda çözünebilen aljinat polimer matrisi içerisine karıştırma yoluyla birleştirilerek *freeze-gelation* metodu kullanılarak aljinatın fiziksel yolla çapraz bağlı hidrojel oluşumunun sağlandığı disk şeklinde poroz skafoldlar üretilmiştir. Polimer matrisi içerisinde hidroksiapatitin homojen dağılımını sağlamak, biyouyumluluğun, biyobozunmanın ve biyoaktivitenin artırılması amacıyla sitrat ilavesi gerçekleştirilmiştir. Pomza katkılı HA entegre edilmiş kompozit skafoldlar üzerine Teikoplanin etken maddesini içeren antibiyotik ilaç entegresi emdirme yolu ile gerçekleştirilmiştir. Aljinat matrisli saf ve PM katkılı HA ilaçlı ve ilaçsız numunelerin kimyasal, morfolojik, termal ve biyolojik analizleri detaylı olarak gerçekleştirilmiştir. Numunelerin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM), kimyasal özellikleri X-ışını kırınımı (XRD), fourier dönüşümlü kızılötesi (F-TIR), enerji dağılımı X-ışını (EDX) ve termal özellikleri termogravimetrik analiz/diferansiyel termal analiz (TGA/DTA) teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Skafoldların biyolojik testleri kapsamında *in-vitro* şişme testleri fosfat tuz tampon (PBS) solüsyonu içerisinde, biyoaktivite testleri ise laboratuvarında hazırlanan yapay vücut sıvısı (SBF) ortamında 37°C’de inkübasyon yolu ile gerçekleştirilerek ağırlık ölçümleri ve morfoloji analizleri gerçekleştirilmiştir. Skafoldların antibakteriyel etkinlik testi disk difüzyon yöntemi ile *Escherichia coli* (*E.coli*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) bakteri kültürleri kullanılarak incelenmiştir. Biyouyumluluk testleri kapsamında *in-vitro* sitotoksitate testleri skafoldların ekstraksiyon metodu ile hücre canlılığı (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) insan osteoblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre %7,5 pomza katkılı HA numunesinde bulunan mikroyapı özelliklerinin kemik onarımı ve yenilenmesi sürecinde istenilen hücrelerin tutunması, göç etmesi ve kan akışı gibi metabolik faaliyetler açısından elverişli bir yapı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Pomza katkılı HA toz partiküllerinin poroz ve birbirine bağlantılı yapılar

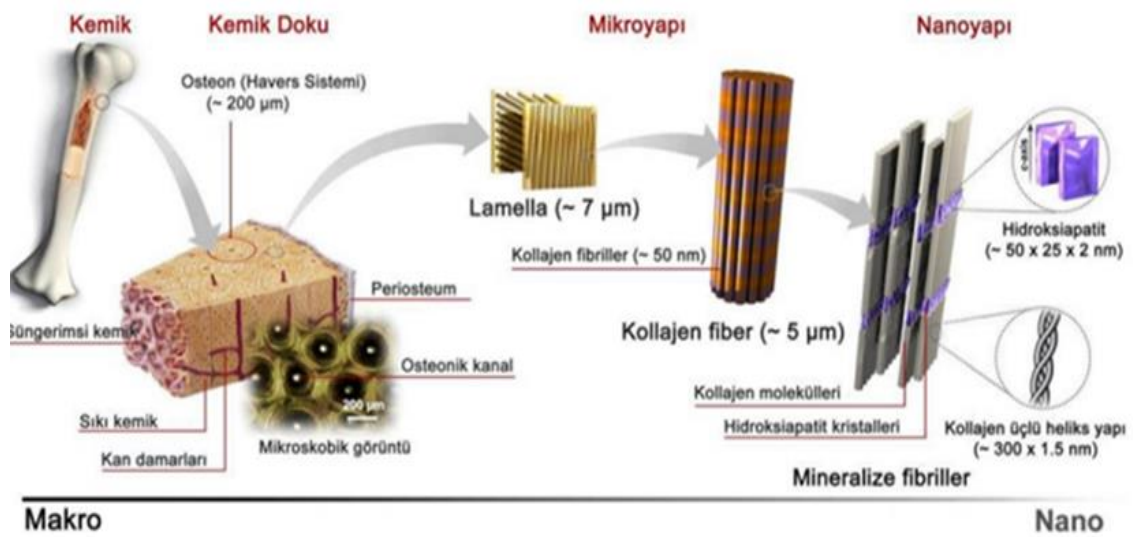
şeklinde aljinat polimer matrisi üzerinde farklı bölgelerde dağıldığı görülmüştür. Aynı zamanda ilaç entegresi yapılmış numunelerin Teikoplanin etken maddesi sayesinde bakterilere karşı belirli miktarda önleyici zon oluşturarak antibakteriyel etkinlik sergilediği görülmüştür. Pomza katkılı hidroksiapatit tozları kullanılarak gözenekli yapıda, içerisinde hücresel faaliyetlerin kolay gerçekleştirilebileceği ve biyolojik çözünürlüğün artırıldığı kemik yenileme kapasitesi artırılmış aljinat matrisli kompozit skafoldlar geliştirilmiştir. Bu antimikrobiyal ilaç entegre edilen kompozit biyomalzemelerin kemik enfeksiyonu tedavisinde kemik yenilenmesini teşvik edici tedavi araçları olarak klinik uygulamalarda kullanım potansiyeli olan bir aday olarak öngörülmektedir. Ayrıca Teikoplanin entegre edilmiş aljinat matrisli pomza katkılı poroz skafoldları, aşamalı antibiyotik salımı ile enfeksiyon risklerine karşı etkin bir tedavi sağlayarak komplikasyonların oluşmasının önüne geçmesi amaçlanmaktadır.

2. BÖLÜM LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Kemiğin Yapısı ve Özellikleri

Kemik, iskelet sistemini oluşturan bir bağ dokusudur. Vücuda destek vermek, hareket etmesini sağlamak ve organları korumak gibi çeşitli özelliklere sahip olan iskelet sisteminin en önemli yapıtaşıdır. Organik ve inorganik kısımlardan oluşan kompozit bir yapıdadır ve kemiğin inorganik kısmını temel olarak bir kalsiyum fosfat bileşiği olan hidroksiapatit oluştururken, organik kısmını ise kolajenler oluşturmaktadır (Logeart-Avranglou 2005). Kemiğin inorganik fazında hidroksiapatitin kristal yapısında karbonat, silikat, magnezyum, potasyum, sodyum, gibi çeşitli iyonik mineraller de yer almaktadır. Hidroksiapatit kristalleri, kolajen liflere sıkı bir şekilde tutunarak HA kristallerinin ve kolajen liflerin sabit kalması sağlanır. Bu tutunma sayesinde kemik gerilmelere karşı direnç kazanır (Sahar vd., 2005) .

Kemiğin diğer bileşeni olan organik fazını yüksek oranda (%95) tip-1 kolajen, kalan küçük kısmını ise proteoglikanlar, glikoproteinler, büyüme faktörleri gibi kolajen içermeyen proteinler oluşturur. Kolajen, dokuların bütünlüğünü sağlayan bir proteindir ve kemiğin lifli yapısının oluşmasını sağlar. Kolajen ve hidroksiapatit kemiğe sertlik ve mukavemet kazandırır (Sadat-Shojai vd., 2013) . Kemiğin hiyerarşik yapısı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kemiğin hiyerarşik yapısı (Sadat-Shojai vd., 2013)

Kemiğin yapısında osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar olmak üzere üç temel hücre tipi mevcuttur. Bu hücreler kemik oluşumunda ve kemiğin yeniden modellenmesinde rol alırlar. Osteoblastlar, mezenkimal kök hücrelerinin bir türüdür ve kemiğin oluşumunu, yeniden şekillenmesini sağlayan hücrelerdir. Osteoblastlar, kemiğin organik fazının büyük oranını oluşturan tip-1 kolajeni ve büyüme faktörünü sentezler. Sentezlenen tip-1 kolajen ve büyüme faktörü kemik oluşumunu hızlandırdığı belirtilmektedir (Katsimbri, 2017).

Osteoklastlar, hareketli ve kemik rezorpsiyonunu gerçekleştiren hücrelerdir. Osteoklastlar ve osteoblastlar kemiğin şekillenmesinde rol alırlar. Hormonsal uyarılara hassas hücreler olan osteoklastların kemik hücreleri yıkımı farklı hormonların (kalsitonin, Parathormonu vb.) kontrolündedir. Osteositler, kemik canlılığı için önemli olan dallanmış şekle sahip hücrelerdir. Dallanmış şekli sayesinde kemikte bulunan kalsiyumun kana iletiminde, vücut sıvısında bulunan kalsiyum miktarının değişmesinde ve kemiğin yenilenmesinde görev alır (Katsimbri, 2017).

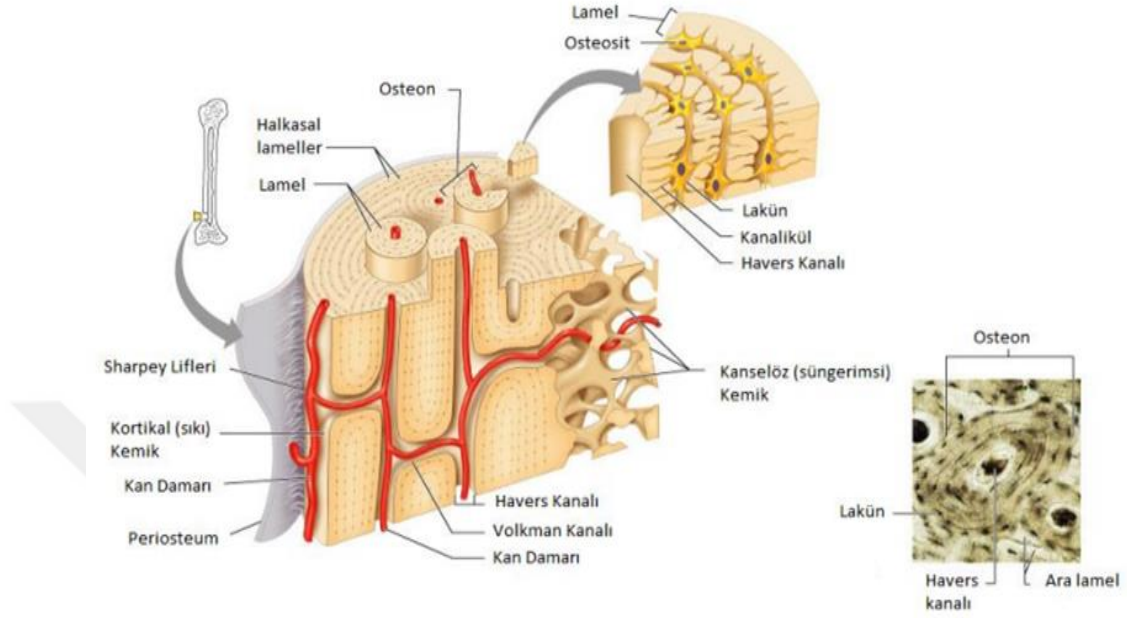
2.2. Kemik Çeşitleri

Kemik dokusu, kortikal ve trabeküler (süngerimsi) kemiklerden oluşmaktadır. İskelet sisteminin %80'inde kortikal kemik, %20'sinde ise trabeküler kemik bulunur (Salgado vd., 2004). Kortikal kemik sert bir yapıya sahiptir ve kemiğin dış kısmında bulunan kabuk görevini görür. Trabeküler kemik ise gözenekli bir yapıya sahiptir ve kemiğin iç kısmında yer alır. Kortikal kemik, kemiğin mekanik özelliklerini desteklerken; trabeküler kemik ise metabolik aktivitelerde görev alır (Martin vd., 2015).

2.2.1. Kortikal (sıkı) kemik

Kortikal kemik, sert bir yapıya sahiptir. Trabeküler kemik, kemiğin iç bölümünde bulunurken kortikal kemik ise dış bölümünde bulunmaktadır (Kocak, 2021). Kemiğin kabuk görevini üstlenen kortikal kemik aynı zamanda uzun kemiklerin shaft kısmında ve omurgada bulunur. Kemiğin mikro yapısı Şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Bu kemiğin yapısına bakıldığında, osteonlardan, osteonların merkezinde bulunan havers kanallarından, bu kanalların çevresini saran lamellerden, lamellerin içerisinde bulunan lakün ve kanaliküllerden oluşur. Osteosit bulduran boşluklar lakünalar, kanaliküli ise laküna ve havers kanalları arasındaki iletişimi sağlayan küçük kanallardır. Havers

kanalları birbirleriyle iletişimi kemik iliği ve volkman kanalları ile sağlamaktadır (Martin vd., 2015).



Şekil 2.2. Kemiğin mikroskopik yapısı (Tuncay, 2013)

2.2.2. Trabeküler (süngerimsi) kemik

Trabeküler kemik, gözenekli bir yapıya sahip olduğu için süngerimsi kemik olarak da bilinmektedir. Uzun kemiklerin uç bölgelerinde ve yassı kemiklerin iç kısmında bulunur. Kortikal kemik %5-10 gözenekliliğe sahipken trabeküler kemik ise %75-90 oranında yüksek bir gözenekliliğe sahiptir (Salgado vd., 2004). Trabeküler kemik birbirleri ile bağlantılı trabekülerden oluşur. Trabekülerin arasındaki gözeneklerde ise kemik iliği bulunmaktadır (Martin vd., 2015).

2.3. Kemik Oluşumu (Ossifikasyon)

Ossifikasyon, kemikleşme olarak da bilinmektedir. Osteoblastlar sayesinde kemiğin oluşmasına ossifikasyon denir. Kemikleşme, endokondral ve intramembranöz olarak iki şekilde sınıflandırılır. Her iki ossifikasyon sonucunda ilk olarak primer (olgunlaşmamış) kemik dokusu oluşmaktadır (Yang vd., 2012).

2.3.1. İnamembranöz ossifikasyon

İnamembranöz ossifikasyonda kemik oluşumu fibröz membranlarda gerçekleşir. Yassı kemikler, kafatası kemikleri, mandibula ve klavikula inamembranöz ossifikasyon

sonucunda şekillenir. Kemik oluşumu için intramembranöz ossifikasyonda mezenşimal hücreler bir araya gelerek ossifikasyon merkezi oluşturur. Daha sonra bir araya gelen mezenşimal hücreler, osteoblastlara dönüştükten sonra osteosit salgılayarak kemik matriksinin sertleşmesini sağlar. Osteositler kemik oluşturmak için kalsifiye olur ve periosteum şekillenmeye başlar. Periosteum şekillenerek kemik oluşumu gerçekleşir (İnsal ve Pişkin, 2017).

2.3.2. Endokondral ossifikasyon

Endokondral ossifikasyon sonucunda ilk olarak kıkırdak oluşur daha sonra kıkırdağın yerini kemik dokusu alır. Yassı kemikler, kafatası kemikleri, mandibula ve klavikula dışında kalan uzun kemikler endokondral ossifikasyon ile oluşur. Bu ossifikasyon çeşidinde kemik oluşumu hyalin kıkırdakta gerçekleşir. İntramembranöz ossifikasyonda mezenşimal hücreleri osteoblast olarak farklılaştırırken, endokondral ossifikasyonda mezenşimal hücreleri kıkırdak oluşturacak kondrablastlara dönüşür. Farklılaşan kondrositler hyalin kıkırdağın modelini oluşturmaya başlar. Diafiz bölgesinde gerçekleşen ossifikasyona primer ossifikasyon, epifiz bölgesinde gerçekleşen ossifikasyona ise sekonder ossifikasyon denir. Bu bölgelerde mezenşimal hücreleri osteoblastlara ve kondrablastlara dönüşerek kalsifikasyon başlamış olur. Kalsifikasyon sonucunda hyalin kıkırdaktaki besinlerin geçişine izin verilmediğinden dolayı kondrositler ölmektedir. Daha sonra diafiz bölgesinde kan damarlarının yerleşmesini sağlayacak şekilde boşluklar oluşur. Hyalin kıkırdak süngerimsi kemiğe farklılaşırken kan damarları oluşan boşluklardan içeri girerler. Süngerimsi kemiğin çevresinde yoğun ve düzensiz şekilde periosteum oluşur. Periosteum şekillenir ve kemik oluşumu tamamlanır (İnsal ve Pişkin, 2017; Mackie vd., 2008).

2.4. Kemiğin Yeniden Şekillenmesi (Remodeling)

Kemiklerin fizyolojik faktörlere ve mekanik kuvvetlere gösterdiği direnç sonucunda şekil değiştirmesine kemiğin şekillenmesi veya modellenmesi denir. Kemiğin yeniden şekillenmesi, zarar gören kemiklerin onarımı ve kemik yapısının korunması için gereklidir. Ergenlik döneminde başlayan kemiğin yeniden şekillenmesi hayat boyunca devam eden bir süreçtir (Clarke, 2008; İnsal ve Pişkin, 2017).

Kemiğin yeniden şekillenmesi, osteoblastlar ve osteoklastların faaliyetleri sayesinde sağlanır. Kemik yapımı birincil ve ikincil ossifikasyon ile gerçekleşir. Birincil

ossifikasyon kolajen fibril topluluğunun oluşturduğu kıkırdak bölgesinde meydana gelir. Kıkırdak bölgesinde gerçekleşen hızlı mineralizasyon sebebiyle kolajenin düzensiz bir yapı sergilediği ve hidroksiapatit ile iletişiminin zayıf olmasından dolayı gelişigüzel dizilmiş bir kemik yapısı oluşur. Gelişigüzel dizilmiş kemik yapısı ikincil ossifikasyon ile düzenli hale gelir (Kocak, 2021; Olszta vd., 2007).

Kemiğin yeniden şekillenmesi birbirini takip eden bir döngü şeklindedir. Bu aşamalar şu şekildedir; aktivasyon, rezorpsiyon, tersine dönme, yapım ve son bulma. Aktivasyon aşaması kemik iliğinde bulunan hücrelerin osteoklastlara dönüşmesiyle başlar ve rezorpsiyon aşamasında osteoklastlar aktive edilir. Bu aşamada osteoklastlar kemik yüzeyine bağlandıktan sonra kemiğin organik fazı enzimler ve hidrojen iyonu salınımı ile parçalanır. Kemiğin organik fazının parçalanmasıyla howship lakünası (boşlukları) ve havers kanalları oluşur. Tersine dönme aşamasında howship lakünasına osteoblastlar toplanır ve kemik yapımı başlamış olur. Daha sonra yapım aşamasında osteoblastlar osteosit sentezleyerek yeni kemiğin oluşumu gerçekleşir. Kemik oluşumu yaklaşık olarak 4-6 ay arasında gerçekleşir (Clarke, 2008). Son bulma aşamasında ise kemiğin oluşumu bitmiş ve yeniden şekillenme tamamlanmıştır (Bayliss vd., 2012; Henriksen vd., 2009; Raggatt ve Partridge, 2010).

2.5. Doku Mühendisliği ve Biyomalzemeler

Hastalıklı veya hasar görmüş insan dokusunun onarılmasını, yenilenmesini, sürdürülmesini ve iyileştirilmesini sağlamak amacıyla biyolojik ikamelerin geliştirilmesini sağlayan disiplinler arası bilim dalına doku mühendisliği adı verilmektedir (Salgado vd., 2004). Geleneksel yöntem olan organ veya doku naklinde enfeksiyon ve doku uyumsuzluğu gibi çeşitli sınırlamalar bulunmaktadır. Bu yöntemlerin kısıtlamalarına çözüm olarak doku mühendisliği veya yenileyici tıp ortaya çıkmıştır. Doku mühendisliği veya yenileyici tıp, geleneksel yöntemler gibi hasarlı dokuyu değiştirmek istemez onun yerine hasarlı dokuyu yenilemek veya destekleyici biyomalzemeler geliştirmeyi amaçlar (O'Brein, 2011) .

Biyomalzemeler, tanı ve tedavide kullanılan doğal veya laboratuvarında üretilen malzemelerdir. Vücut sıvılarıyla sürekli veya belirli aralıklarla temas halinde olduğunda uyum sağlaması beklenen malzemelerdir. İnsan vücudunun çeşitli bölgelerinde plaka, diş dolguları, vida, çivi, protez, dikiş ipi, iğneler, yapay kalp kapakları, omuz, kalça, bilek

gibi implant malzemeleri olarak kullanılabilir. Biyomalzemeler; metalik, polimerik, kompozit ve seramik malzemeler olmak üzere dört farklı şekilde sınıflandırılırlar (Wong ve Bronzino, 2007).

2.5.1. Biyomalzemelerin özellikleri

Biyomalzemeler, vücut içerisinde farklı yerlerde kullanılır bu yüzden bu şartlara uyumlu ve dayanıklı olması beklenir. Çeşitli alanlarda ve farklı koşullarda kullanıldıkları için biyomalzemelerden beklenen özellikler vardır. Biyomalzemelerin kullanıldıkları yerlerde dokuya zarar vermesi, alerjik reaksiyon vermesi, vücudun anormal tepki vermesi istenmez.

2.5.1.1. Biyoyumluluk

Biyomalzemelerden istenilen en önemli özellik biyoyumlu olmasıdır. Biyoyumluluk, biyomalzemenin kullanıldığı ortamdaki dokular ve vücut tarafından kabul edilmesidir. Kısaca malzeme ve vücudun uyuşabilir olması olarak da tanımlanabilir. Biyoyumlu bir malzeme vücut ile fiziksel ve biyolojik olarak uyum içindedir, enfeksiyon, ialerjik reaksiyon gibi yan etkiler göstermez (O'Brein, 2011).

2.5.1.2. Gözeneklilik

Biyomalzemeler, doku büyümesini sağlamak için yeterli gözenekliliğe sahip olmalıdır. Gözenekler, besinlerin, oksijenin ve atıkların taşınmasında görev alır. Hücrelerin canlılığı ve geçirgenliği için gözenek büyüklüğünün en düşük 75-100 μm olması gerektiği bildirilmektedir. Kemik yapısının oluşması için ise gözenekliliğin en az 300 μm olması gerektiği belirtiliyor çünkü büyük gözenekler kan damarlarının yayılmasını sağlayarak yeni kemik oluşumuna destek olmaktadır (Götz vd., 2004; Hulbert vd., 1970). Yapılan bir çalışmada %10 ve %20 mikro gözenekliliği bulunan hidroksiapatit skafoldlar (gözenek boyutu makro ölçek ($>50 \mu\text{m}$) ve mikro ölçek ($>20 \mu\text{m}$)) karşılaştırılmıştır ve daha yüksek mikro gözenekliliğin kemik büyümesini hızlandığı bu sayede anjiyogenezin artarak biyoaktivite ve osteointegrasyona neden olduğu görülmüştür (Hing vd.,2003, 2004; Kocak, 2021).

2.5.1.3. Biyobozunurluk

Biyomalzemeler için biyobozunurluk önemli bir özelliktir çünkü biyomalzemeler kısa süreli takviye sağlar ve zamanla bozunarak doku ile yer değiştirmesi gerekir.

Biyobozunma hızı biyomalzemenin kullanım amacına, işlevine ve özelliklerine göre değişirken, doğal dokunun yenilenme hızına paralel olarak gerçekleşmesi beklenir (Fillingham ve Jacobs, 2016; Kocak, 2021). Biyomalzeme uzun süre için kullanılacaksa biyobozunmanın yavaş bir şekilde gerçekleşmesi istenirken, doku onarımı ve yenilenmesi gibi durumlarda hızlı bozunma gerçekleşmelidir. Bozunma sonucunda ortaya çıkan ürünler enfeksiyona neden olmamalı, toksik olmamalı, vücutta zararlı bir etki göstermemeli ve kolay bir şekilde atılabilmelidir (O'Brein, 2011).

2.5.1.4. Biyoaktivite

Biyoaktivite, Kemik Doku Mühendisliği'nde biyomalzeme ile kemik dokusunun ara yüzeyde bağlanma becerisi olarak tanımlanır. Birleşmenin süresi malzemeye göre değişmektedir. Hasar görmüş kemiğin tedavisinde kullanılan biyomalzemelerde biyoaktivite, laboratuvarında üretilmiş vücut sıvısı içerisinde bekletildikten sonra apatit tabakası oluşturma kapasitesidir (Kuzielová vd., 2011).

2.5.2. Biyomalzemelerin sınıflandırılması

Biyomalzemeler; metaller, seramikler, polimerler ve kompozitler olmak üzere dört farklı şekilde sınıflandırılırlar (Stevens vd., 2008). Kompozit malzemeler, farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip iki veya ikiden fazla malzemenin bir araya getirilmesiyle oluşan malzemelerdir. Metaller, seramikler veya polimerler tek başına kullanıldıklarında zayıf özellikler gösterebiliyorken bu malzemelerden oluşturulan kompozit malzemeler kullanıldığında zayıf özellikler güçlendirilebilmektedir. Kompozit biyomalzemeler kemik iskelesi, kemik kırığı onarımı, diz, kalça ve diş protezleri gibi alanlarda kullanılmaktadır (Davis ve Leach, 2008).

2.5.2.1. Metalik biyomalzemeler

Metalik biyomalzemeler, mekanik özellikleri nedeniyle ağırlık taşıyabilen kemik implantların kullanımı için uygundur. Metaller yüksek dayanıklılık, aşınma dirençleri ve şekillendirilebilirlik gibi avantajlarından dolayı tercih edilmektedir. Avantajlarının yanında zayıf korozyon direnci, yüksek sertlikte ve biyo inert olması gibi dezavantajları vardır. Metalik biyomalzemeler iyi mekanik özelliklerinden dolayı diz, kalça ve omuz protezleri gibi ortopedik uygulamalarda sıklıkla kullanılır. Günümüzde yaygın olarak

kullanılan metalik biyomalzemeler; paslanmaz çelik, titanyum alaşımları ve kobalt-krom alaşımlarıdır (Wong ve Bronzino, 2007).

2.5.2.2. Polimerik biyomalzemeler

Polimer, monomerlerin birbirleriyle bağlanarak oluşturduğu uzun zincirlere sahip moleküllerdir. Biyomalzeme olarak kullanılan polimerler kaynağına göre iki sınıfa ayrılır. Bunlar; doğal ve sentetik polimerlerdir. Doğal polimerler bitkilerden, hayvanlardan veya organizmalardan elde edilebilir. Kitin, kitosan, kolajen, aljinat ve ipek doğal polimerlere örnek verilebilir. Ayrıca doğal polimerlerin en önemli özelliği hücre büyümesini teşvik etmesidir. Çözelti, jel ve toz şekilde üretilebilen doğal polimerler doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılır. Sentetik polimerler, kimyasal olarak kararlı ve korozyon direncine sahip olmaları ile dolgu malzemesi olarak, çeşitli protezlerde ve birçok uygulamada kullanılmaktadır. Biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilen sentetik polimerler; polietilen (PE), poliüretan (PU), polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polivinilklorür (PVC), polipropilen (PP), poliamid ve polistiren (PS). Polimerler zayıf mekanik özellikleri ve temizlenmelerinin zor olması gibi dezavantajları olmasına rağmen ekonomik olmaları, çeşitli özelliklerde üretilebilmeleri, şekillendirilebilir olmaları sayesinde yaygın olarak kullanılırlar (Sathiyavimal vd., 2020).

2.5.2.3. Seramik biyomalzemeler

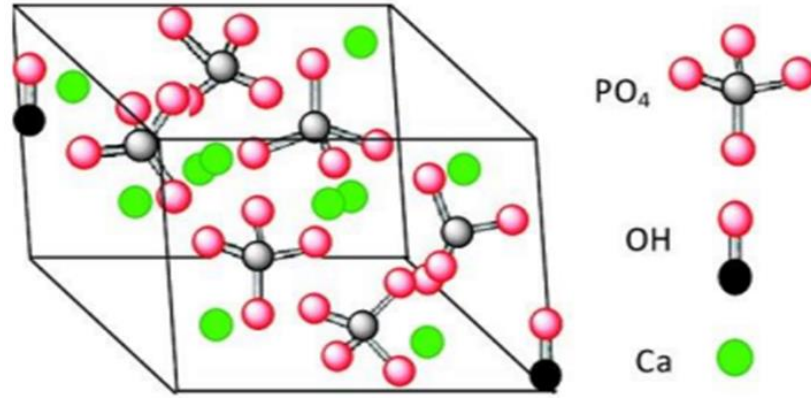
Biyoseramikler yüksek basınca ve aşınmaya karşı dirençli olduklarından kaplama malzemesi, kemik protezleri, kalça ve diz implantlarında kullanılır (Kocak, 2021). Seramik biyomalzemeler, biyoinert, biyoaktif ve biyobozunur olmak üzere üç kategoriye ayrılır (Hench, 1991). Biyoinert seramik malzemeler doku ile kimyasal bağ oluşturmazlar. Bu malzemeler kullanıldığında malzeme etrafında ince bir fibröz doku oluşumu görülür. Alümina ve zirkonya biyoinert seramiklere örnektir. Doku ile implant arasında doğrudan bağ oluşturabilen malzemeler biyoaktif seramiklerdir. Ayrıca biyoaktif seramikler kemik dokusunun malzeme içerisinde büyümesini sağlayarak implantın vücut içerisine uyum sağlamasına neden olur. Hidroksiapatit, cam ve cam seramikler biyoaktif seramiklere örnektir. Diş implantlarında, ortopedik protezlerin kaplamalarında, kafatası kemiklerinde toz formda kullanılmaktadır. Biyobozunur seramikler biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerdir. Bu malzemeler bozunarak dokunun yerini alırlar ve

bozunduktan sonra vücutta hiçbir yabancı madde kalmaz. Tri-kalsiyum fosfat biyobozunur seramik malzemelere örnektir (Fillingham ve Jacobs, 2016).

2.6. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HA), kemiğin ve dişin inorganik yapısında bulunan kalsiyum fosfat esaslı biyoseramik bir malzemedir. Hidroksiapatit kemik, diş gibi doğal yollardan elde edilebildiği gibi sentetik olarak da üretilebilir. Kimyasal formülü $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ ve Ca/P oranı ise 1,67'dir. Hekzagonal ve monoklinik olmak üzere iki farklı kristal yapısına sahiptir. Hidroksiapatitin kristal yapısı Şekil 2.3.'te verilmiştir. Hekzagonal yapının sahip olduğu kafes parametreleri; $a=b=9.432 \text{ \AA}$, $c=6.881 \text{ \AA}$ ve $\gamma=120^\circ$, monoklinik yapının sahip olduğu kafes parametreleri; $a=9.421 \text{ \AA}$, $b=2a$, $c=6.881 \text{ \AA}$, and $\gamma=120^\circ$. Hidroksil iyonunun konumundan dolayı iki kristal yapı birbirinden farklıdır (Okada ve Furuzono, 2012).

Biyoseramik malzeme grubunun üyesi olan hidroksiapatit biyoaktif özelliği sayesinde kemik ile kimyasal olarak bağ kurabilen biyoyumlu bir malzemedir. Bu nedenle hidroksiapatit biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılır (Liu vd., 2013).



Şekil 2.3. Hidroksiapatit kristal yapısı (Evcin ve Özdem, 2019)

2.6.1. Hidroksiapatitin özellikleri

Hidroksiapatit kalsiyum fosfat temelli, oldukça biyoyumlu ve biyoaktiviteye sahip seramik biyomalzemedir. İyonik özelliğe sahip olduğundan dolayı yapısındaki iyonlar ile çeşitli iyonlar yer değiştirebilir. Hidroksiapatit gözenekli bir yapıya sahiptir bu gözenekler içerisinde hücre büyümesi gerçekleşir. Ayrıca gözenekler sayesinde kemik

dokusuna kan ve diğer sıvıların taşınması sağlanır. Gözenekli yapıya sahip olmasının dezavantajı ise mekanik dayanımını azaltmasıdır (Lin vd., 2012).

Hidroksiapatit kırılımandır ve tokluğu zayıftır bu zayıf mekanik özelliklerinden dolayı bazı alanlarda tek başına kullanımı istenmez ancak bu özelliklerini geliştirmek için kompozit malzeme olarak kullanımı önerilmektedir. Kimyasal olarak oldukça kararlıdır ve asit dışındaki çözücülerde çözünme gerçekleşmez. Hidroksiapatit alerjik, toksik, kanserojenik ve enfeksiyon gibi özellikler göstermemektedir. Osteokondüktif özelliği sayesinde hidroksiapatit yeni kemik oluşturabilme yeteneğine sahiptir (De Aza vd., 2005).

2.6.2. Hidroksiapatitin kullanım alanları

Hidroksiapatitin biyomedikal alanda kullanımı yapılan araştırmalar ve uygulamalar sonucunda giderek yaygınlaşmıştır. Kemik hasarının onarımı ve tedavisinde implantlarda kaplama olarak (Darr vd., 2004), diş dolgusunda ve implantlarında (Pushpalatha vd., 2023)ve ilaç salınım sistemleri (Matsumoto vd., 2004) gibi başlıca uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Günümüzde hidroksiapatitin sık kullanıldığı alanlardan bir tanesi dental uygulamalardır. Nano boyuttaki hidroksiapatitin diş yüzeyinde hızlı absorplandığı ve dişin doğal yapısına dönüşebildiği için diş hasarlarında kullanılabileceği bildirilmektedir (Du vd., 2021).

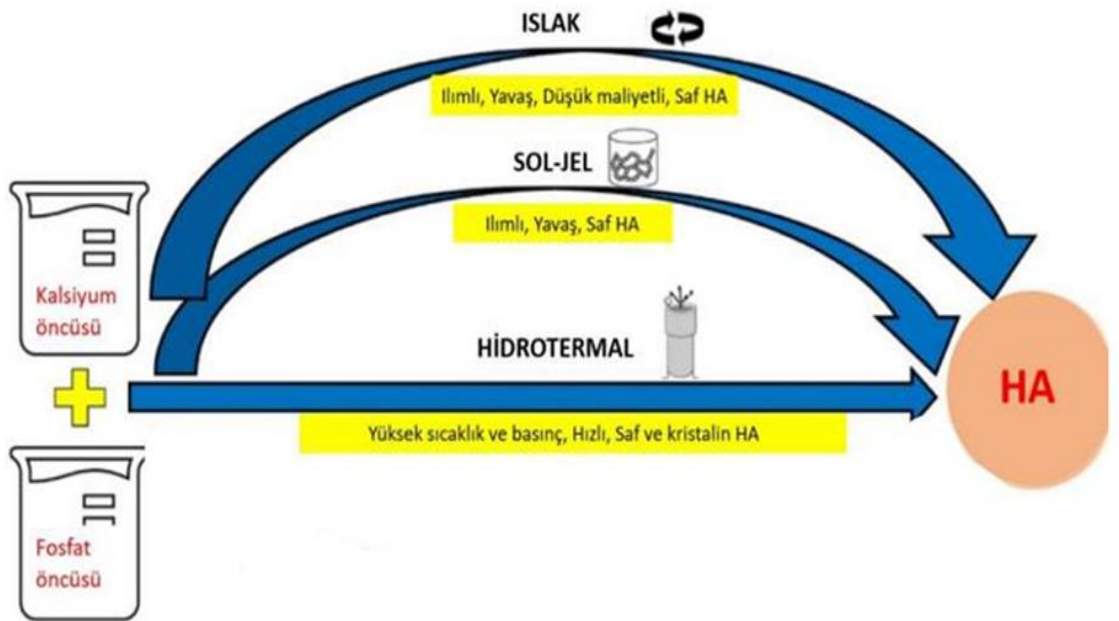
Kemik iskelesi olarak hidroksiapatitin kullanımı önemli uygulama alanlarından bir tanesidir. Kemik iskelelerinde amaç yalnızca zarar gören kemik dokusunun onarımı değil kullanıldığı yerde yeni kemik oluşumunu sağlamaktır. Bu nedenle kemik iskelelerinden istenen özellik hücrelerin yapıya girerek hücre büyümesini gerçekleştirmesidir. Kemik iskelelerinden istenilen bu özelliğin sağlanması için hidroksiapatitin biyoaktif özelliğinden ve gözenekli yapısından yararlanır (Wei ve Ma, 2004).

Hidroksiapatitin kullanıldığı diğer önemli alanlardan bir tanesi ilaç salınım sistemleridir. Bu sistemler kemik onarımında kemiğin yenilenmesini ve şekillenmesini desteklemek amacıyla kullanılmaktadır. İlaç salınım sistemleri antibiyotik ilaçlar, hormonlar ve vitaminlerin zarar gören dokulara sistemli bir şekilde verilmesi için geliştirilmiştir. Kontrollü bir şekilde ilaçların salınımının gerçekleşmesi için taşıyıcılar gerekmektedir. Hidroksiapatit, biyoyumluluğu ve biyoaktif özellikleri sayesinde ilaç salınım sistemlerinde taşıyıcı olarak kullanılabilmektedir (Wei vd., 2020).

Ortopedik uygulamalarda da hidroksiapatitin kaplama malzemesi olarak kullanımı yaygındır. Mekanik özelliklerinin zayıf olmasından dolayı hidroksiapatitin yük taşıması gereken uygulamalarda tek başına kullanımı tercih edilmemektedir. Bu uygulamalarda genellikle biyomalzeme olarak metaller kullanılır. Fakat metaller biyoinert özelliklerinden dolayı tek başlarına kullanıldığında istenilen etkiyi veremezler. Hidroksiapatitin metallerde kaplama malzemesi olarak kullanıldığında biyouyumluluk ve biyoaktif özellikleri artar (Sopyan vd., 2007).

2.6.3. Hidroksiapatitin üretim yöntemleri

Hidroksiapatit üretim yöntemleri kuru (katı hal sentezi) ve ıslak (yaş kimyasal sentez) yöntem olarak iki sınıfa ayrılabilir. Üretim sırasında kullanılan şartlara göre farklı boyutlarda, morfolojilerde ve saflıkta hidroksiapatit sentezi gerçekleştirilir. Çeşitli hidroksiapatit üretim yöntemleri olmasına rağmen biyomedikal uygulamalarda ıslak sentez teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. HA'nın çeşitli ıslak sentez yöntemleri Şekil 2.4.'te gösterilmiştir. Bunlar; sol-jel, hidrotermal ve kimyasal çöktürme yöntemleridir (Sadat-Shojai vd., 2013).



Şekil 2.4. HA'nın çeşitli ıslak sentez yöntemleri (Varadavenkatesan vd., 2021)

2.6.3.1. Hidrotermal yöntem

Hidrotermal yöntem kalsiyum ve fosfat öncüleri kullanılarak yüksek sıcaklık ve basınca bağlı olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle hidroksiapatit üretimi 60-150 °C sıcaklıkta 24 saatte tamamlanır. Hidrotermal yöntem sayesinde homojen ve yüksek kristal yapıya sahip hidroksiapatit elde edilmektedir. Ayrıca bu teknik kolay kontrol edilebilir olması, verimli olması ve basit olması nedeniyle tercih edilmektedir (Zakaria vd., 2013).

2.6.3.2. Kimyasal çöktürme yöntemi

Kimyasal çöktürme hidroksiapatit üretiminde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilk olarak kalsiyum ve fosfat öncüleri karıştırılıp çözeltiler hazırlanılarak işleme başlanır. Daha sonra çöktürme, yaşlandırma, yıkama, filtrasyon ve kurutma işlemleri sırasıyla yapılır. Yöntemde öncüllerin konsantrasyonları, reaksiyonun sıcaklığı, hızı ve pH'ı gibi pek çok değişken bulunmaktadır. Bu parametreler sentezlenecek ürünün saflığını, boyutunu ve şeklini etkileyebilmektedir. Ekonomik, basit ve düşük sıcaklıklarda işlemin gerçekleştirilmesi yüksek saflıkta ürün elde edilebilmesi yöntemin avantajlarıdır (Norton vd., 2006).

2.6.3.3. Sol-jel yöntemi

Hidroksiapatit sentezi için en çok tercih edilen sol-jel yöntemidir. Diğer sentez yöntemlerine göre sol-jel yöntemi daha kullanışlıdır. Bu yöntemin avantajları nano boyutlu ve homojen parçacıklar elde edilebilmesidir. Yüksek sıcaklık gerektirmeyen (100°C altı), kalsiyum ve fosfat öncülerin kullanıldığı tekrar edilebilir kolay bir yöntemdir. Sol-jel sentezinde, sol şeklinde isimlendiren kalsiyum ve fosfat öncüleri karıştırılarak bir solüsyon hazırlanır. Daha sonra bu solüsyon bir jel yapıya dönüşür. Jel oluşumu reaksiyon sıcaklığına ve pH'a bağlı olarak değişebilmektedir. Sol-jel yöntemi düşük sıcaklıkta ve basınçsız ortamda gerçekleştirilebildiği için yüksek saflıkta ürün elde edilmesini sağlar. Bu yöntemin olumsuz özelliği ise reaksiyon süresinin uzun olmasıdır (Kuriakose vd., 2004).

2.6.4. Biyomimetik iyon değişimli hidroksiapatit

Biyomimetik iyon değişimi laboratuvar ortamında üretilen hidroksiapatit yapısını biyolojik apatite benzetmek amacıyla yapılmaktadır. İyon katkıları hidroksiapatitin zayıf mekanik özelliklerini güçlendirirken kemik yenilenmesini de hızlandırır. Hidroksiapatit için en önemli iyon katkıları; karbonat, silikat, magnezyum, sodyum, gümüş, çinko ve

potasyum vb. iyonlardır. İyonik değişimler hidroksiapatitin kristalliğini, morfolojisini, boyutunu ve çözünürlüğünü etkilemektedir (Shepherd vd., 2012). Hidroksiapatit için önemli bazı iyon katkıları aşağıdaki başlıklarda ele alınmıştır.

2.6.4.1. Karbonat

Kemiğin yapısındaki biyolojik apatit kütlece %4-8 oranında karbonat iyonu içermektedir. Bu oranda en fazla miktarda bulunan iyonun karbonat olduğunu göstermektedir. Saf hidroksiapatite göre karbonat katkılı hidroksiapatitte osteoklastların hızlı bir şekilde emilimi geręekleřtirilerek yeni kemik oluşumunu teşvik eder. Karbonat iyonunun hidroksiapatite katkılanması sonucu çözünebilme özelliğinde artma, kristalliğinde azalma görölmüştür (Landi vd., 2003).

2.6.4.2. Magnezyum

Magnezyum (Mg) kemik için temel bir elementtir. Magnezyum eksikliğinde kemik büyümesi durur ve kemiğin kırılmasına yol ağar. Ayrıca osteoblast fonksiyonlarının azalmasına ve kemiğin mekanik dayanımının zayıflamasına neden olur. Hidroksiapatite magnezyum iyonu eklenmesi ile hidroksiapatitin çekirdeklenmesi artmaktadır (Boanini vd., 2010).

2.6.4.3. Florür

Flor (F) antibakteriyel özellik gösteren bir elementtir. Flor elementi eklenen hidroksiapatit kemik hasarlarının tedavisinde ve diş minesinin asitlere karşı dayanıklılığını arttırmak için kullanılır. Ayrıca flor elementi kemik oluşumunu hızlandırır ve kemik hücrelerinin büyümesini sağlamaktadır. Uygun konsantrasyonlarda kullanıldığında diş çürüklerini engelleyebilir fakat yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında ise toksik etkilere yol ağabilir. Geręekleřtirilen bir araştırmada flor iyonu katkılı hidroksiapatit, saf hidroksiapatite göre biyoyumluluğunun ve biyoaktivitesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Cazalbou vd., 2005).

2.6.4.4. Sitrata

Vücutta bulunan sitratin yaklaşık olarak %80'i kemiklerde depolanır ve kemiğin organik fazının içerisinde yaklaşık %1-5 oranında sitrat bulunmaktadır. Kemik yenilenmesinde ve vücuttaki metabolik işlevlerin düzenlenmesinde de sitratin önemli bir yeri vardır. Sitrata, vücuttaki metabolik işlevler için mitokondride üretilerek hücresele enerji düzenlemesinin yanında lipid üretimi ve bölünmesi, aminoasit üretimi ve bağışıklık reaksiyonları gibi görevleri bulunmaktadır. Aynı zamanda kolajen mineralizasyonunu teşvik ettiği bilinen sitratin kemik erimesinde tedavi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda osteoblastlar tarafından üretilerek kemiğin yapısında hidroksiapatitle birleşik ve kolajenle birleşik şekilde bulunan sitrat olmak üzere iki temel sitrat havuzunun olduğu belirtilmiştir. Kemik yenilenmesinde sitratin görevleri şunlardır; kalsiyum ve fosfatın birikme hızını azaltır, HA kristallerinin çekirdeklenme prosesini destekler ve hidroksiapatit kristallerine kuvvetli bir şekilde bağlanarak büyümesini kısıtlar. Sitrata sayesinde yeterli büyüklükte ve kararlı HA kristalleri elde edilerek kemik dokusunun oluşumuna katkıda bulunulur. Kısacası sitrat kemiğin kararlılığı, dayanıklılığı ve kırılma direnci gibi mekanik özelliklerinin korunması için hidroksiapatitin önemli bir parçasıdır (Liu vd., 2024; Ruiz-Agudo vd., 2021; D Sun vd., 2014).

2.6.4.5. Silikat

Silisyum elementi kemik büyümesinde ve yeniden oluşmasında önemli bir göreve sahiptir. Ortosilisik asit formunda olan silisyum, alkaline fosfataz ve osteokalsin aktivitelerini arttırarak kolajen sentezini hızlandırır bunun sonucunda kemik oluşum süreci hız kazanmaktadır (Reffitt vd., 2003). Hidroksiapatite silikat iyonu eklenmesi ile apatitin parçacık boyutunun küçülmesine ve çözünürlüğünün artmasını sağlamaktadır ayrıca osteoklastların aktivitesi artmaktadır (Pietak vd., 2007).

2.7. Pomza

Pomza, silisyum temelli alümina-silikat bileşiği olan bir mineraldir. Volkanik faaliyetler gerçekleşirken hızlı bir şekilde soğuma sonucunda oluşmuş gözenekli, camsı ve hafif bir yapıya sahiptir. Pomza ülkemizde farklı şekillerle de isimlendirilmektedir bunlar; süngertaşı, topuk taşı ve hışır taşıdır (Boyraz ve Nalbant, 2015).

2.7.1. Pomzanın özellikleri

Pomza silisyum temelli alümina silikat bileşiği olduğu için yapısında birçok oksidi bulundurmaktadır. Yapısında ağırlıklı olarak %60-75 oranda SiO₂ (silisyum oksit), %13-17 oranda Al₂O₃ (alüminyum oksit) ve %7-8 oranda Na₂O (sodyum oksit) ve K₂O (potasyum oksit) bulunurken aynı zamanda Ca, Mg, Fe, Zn ve Cu vb. gibi birçok oksidi içermektedir. Yapısında bulundurduğu silisyum oksit sayesinde pomza iyi bir aşındırıcıdır. Alüminyum oksit ise pomzaya ısı ve sıcaklığa karşı dayanıklılık özelliği sağlamaktadır (Dinçer vd., 2015).

Pomza hızlı soğuma sonucu oluştuğu için oldukça gözenekli bir yapısı vardır. Sahip olduğu gözenek oranı %45-70 arasında farklılık gösterebilmektedir ve gözenekler sayesinde adsorpsiyon potansiyeli yüksektir. Gözenekler arasında camsı bir zar vardır bu yüzden birbirleriyle bağlantıları azdır. Bu nedenle pomzanın geçirgenlik özelliği zayıf ama ısı ve ses yalıtım özelliği kuvvetlidir (Kılınç Aksay vd., 2016). Pomza kimyasal ve fiziksel reaksiyonlara karşı kararlı bir yapı göstermektedir. Hidroflorik asit dışında pomza asitlerle reaksiyona girmemektedir. Yoğunluğu 1-2 gr/cm³ ve göre sertliği mohs ölçeğine göre 5-6 arasında değişmektedir. Aynı zamanda pomza 650°C'ye kadar kararlılığını koruyabilir ve erime sıcaklığı 1340°C'dir (Rashad, 2019).

2.7.2. Pomza çeşitleri

Volkanik olaylar gerçekleşirken magmanın sıcaklığı, yoğunluğu ve soğuma hızı gibi etkenler pomzanın çeşitli yapılarda oluşmasını sağlamaktadır. Asidik ve bazik pomza olmak üzere iki çeşit pomza türü bulunmaktadır. Yaygın olarak bulunabilen ve sık kullanılan asidik pomzadır. Kirli beyaz veya tam beyaz renkte bulunmaktadır. Aynı zamanda 0,5-1 gr/cm³ yoğunluğa sahiptir. Yapısında %72,5 oranda silisyum ve %14 oranda alüminyum içermektedir. Yüksek miktarda silisyumun varlığı asidik pomzaya aşındırıcılık sağlamaktadır. Asidik pomza sıklıkla inşaat alanında hafif yapı malzemesi olarak kullanılmaktadır. Bazik pomza genellikle kahverengi veya siyaha yakın bir renkte bulunmaktadır. Yoğunluğu 1-2 gr/cm³ arasında değişmektedir. Asidik pomzaya göre akışkanlığı daha düşüktür. İçerisinde yaklaşık %45 oranda silisyum ve %21 oranda alüminyum bulundurmaktadır. Bazik pomza yapısındaki mineral oksitlerden dolayı tarım ve gübre sektöründe kullanımı tercih edilmektedir (Güngör ve Özkan, 2001).

2.7.3. Pomzanın kullanım alanları

Pomza yaygın olarak başta inşaat daha sonra ise tarım, tekstil ve kimya gibi sektörlerde kullanılmaktadır. İnşaat sektöründe sıklıkla hafif beton agregası, çatı kaplama elemanı, binaların ısı ve ses yalıtım malzemesi ve çimentoda katkı malzemesi olarak kullanılmaktadır. Pomzanın hafif olması, gözenekli yapısı, yüksek basınç direnci, sıcaklığa ve neme dayanıklı olması inşaat alanında çok fazla kullanılmasının nedenleridir. Betonlarda kum yerine pomza eklendiğinde betonun daha hafif, mukavemetli, elastik, yüksek ısı ve ses yalıtımına sahip olduğu görülmüştür (Rashad, 2019).

Tekstil sektöründe pomza kullanımı önemli bir yere sahiptir. Pomza iyi bir aşındırıcı olduğu için kot taşlama olarak bildiğimiz kumaşların renklerinin açılması ve yumuşatılması işleminde kullanılmaktadır. Bu alanda kullanılacak pomzanın daha aşındırıcı olması gerektiğinden asidik pomza tercih edilmektedir (Elaissi vd., 2022).

Kolay, ucuz elde edilebilmesi ve yüksek su tutabilme özelliğinden dolayı tarım sektöründe kullanım alanı geniştir. Su kaynakları kısıtlı veya kurak bölgelerde pomzanın yüksek su tutma kapasitesinden yararlanılarak toprağın uzun süre nemli kalması sağlanır. Aynı zamanda verimsiz topraklarda ve topraksız bitki yetiştiriciliğinde pomza kullanımı verimi arttırmaktadır (Boyraz ve Nalbant, 2015).

Pomza kimya sektöründe uzun zamandır yaygın olarak kullanılmaktadır. Boyalarda katkı malzemesi, tarım ilaçları ve gübrelerde topaklaşmamayı sağlayan katkı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca sabun ve deterjan üretiminde katkı malzemesi, diş macunları ve diş pastalarının içeriğinde kullanılmaktadır (Fragoso vd., 2011).

2.7.4. Pomzanın biyolojik alanda kullanımı

Pomza farklı sektörlerde geniş uygulama alanına sahip bir malzemedir. Yapılan çalışmalar sonucunda pomzanın ekonomik ve kolay üretimi, geniş yüzey alanlı gözenekli yapısı, yüksek silisyum oranı ve biyoyumlu olması nedeniyle pomza minerali ilaç salınım sistemleri ve doku mühendisliği alanlarında kullanılabilecek potansiyelde bir malzeme olduğu görülmüştür.

Pomzanın biyomedikal uygulamalarda kullanımına örnek olarak; yapılan bir çalışmada pomza ilaveli polivinil alkol (PVA) / polivinil pirolidon (PVP) çapraz bağlanan hidrojeller üretilmiştir. Hidrojellere yapılan testler sonucunda çapraz bağlayıcı olarak kullanılan

pomza ilavesi bağlanma oranını arttırmış ve şişme oranını azalttığı görülmüştür. İlaç salınımlarında pomza katkılı hidrojelatin ilaç emilimini arttırdığı belirtilmiştir (Taşdelen, 2018). Başka bir çalışmada ise Cu^{+2} iyonu yüklenmiş nano boyutlu pomza, polimer esaslı bir kryo-jellere eklenerek yeni kompozitler üretilmiştir. Kompozitlerdeki pomza ilavesinin, kan plazma proteini ve sığır serum albümin (BSA) gibi enzim stabilizatörlerinin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir artışa neden olduğu görülmüştür (Acet, 2021).

Pomzanın kemik onarımı ve yenilenmesi için biyouyumluluk testleri gerçekleştirilmiştir. Pomzanın sitotoksikite test sonuçlarına göre hücre çoğalması ve yapışması için uyumlu olduğu, kemik hücreleri ile biyouyumlu olduğu ve mineralleşmeyi sağladığı gözlemlenmiştir (Li vd., 2010). Diğer bir çalışmada ise sığır kemiklerinden elde edilen hidroksiapatite, alümina (Al_2O_3) ve pomza eklenerek kompozitler üretilmiştir. Bu kompozitlerde mikrosertlik ve mukavemet gibi mekanik özelliklerde artış görülmüştür (Komur vd., 2016).

Pomzanın içerdiği zengin silisyum elementi varlığı ve gözenekli yapısı nedeniyle yapay kemik malzemesi olarak kullanılabilmesi düşünöldüğü için bazı araştırmalar yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda silisyum elementi osteoblastların büyümesini, kolajen üretimini teşvik ettiği ve kemik oluşumunu hızlandırdığı bildirilmiştir (Reffitt vd., 2003).

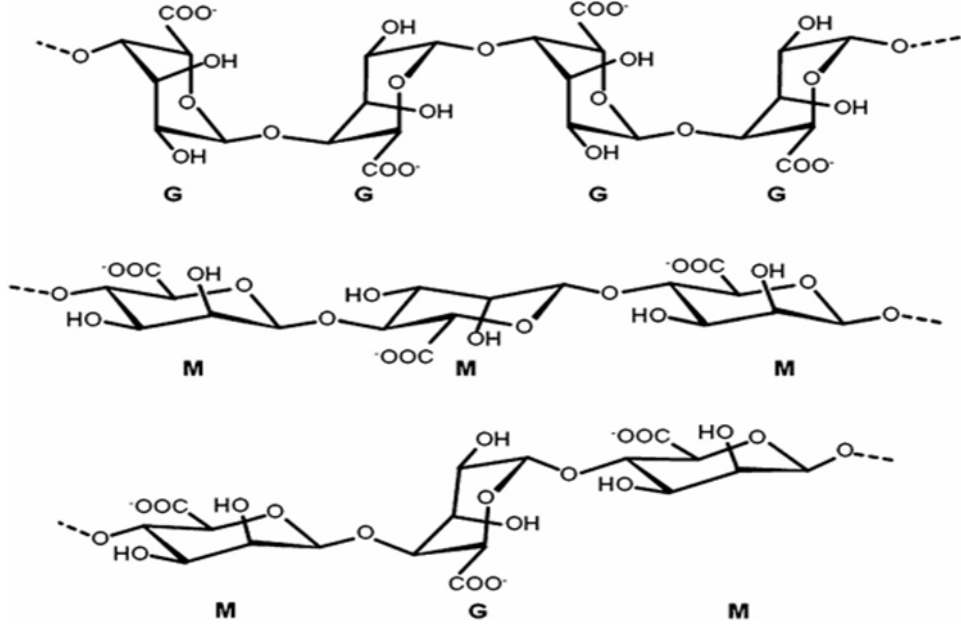
2.8. Aljinat

Aljinat kahverengi alglerden elde edilen doğal anyonik bir polisakkarittir. Biyouyumlu, biyobozunur, gözenekli yapı, yüksek su tutma potansiyeli ve ekonomik olması gibi çeşitli özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Aynı zamanda aljinat hücrelerin tutunmasında ve iletilmesinde matriks olarak kullanılabilen, organik çözücüler olmadan jel oluşturabilen bir malzemedir (Gombotz ve Wee, 1998).

2.8.1. Aljinatın özellikleri

Aljinat mannuronik (M) ve guluronik (G) asitten oluşan bir lineer kopolimerdir. Yapısı sıralı guluronik asit yani G birimlerinden (GGGGG) ve mannuronik asit olan M birimlerinden (MMMMM) oluşmaktadır. Aljinat polimerindeki G bloğu, M bloğu ve G/M bloklarının kimyasal yapıları Şekil 2.5.'te gösterilmiştir. Çeşitli kaynaklardan elde

edilen aljinatların, M ve G birimlerinin uzunlukları ve bileşimleri farklı olmaktadır (Tonnesen ve Karlsen, 2002).



Şekil 2.5. Aljinat polimerindeki G bloğu, M bloğu ve G/M bloklarının kimyasal yapıları (Lee ve Mooney, 2012)

Aljinatın G birimin uzunluğu ve moleküler ağırlığının artması fiziksel özelliklerini iyileştirmektedir. Aljinat ile hazırlanan çözeltilerin viskozitesi pH düştüğü zaman artmaktadır. En önemli özelliklerinden biri iki değerliğe sahip iyonların eklenmesiyle aljinatın jelleşme göstermesidir. Jel oluşturmak için en çok tercih edilen iyon ise kalsiyumdur (Ca⁺²). İki değerlikli iyonlar sayesinde güçlü ve suda çözünmeyen jel yapılar oluşmaktadır (Gombotz ve Wee, 1998).

Aljinatın biyoyuurluluğu saflık derecesi ile ilgilidir. Doğal kaynaklardan elde edilen aljinatlarda ağır metal gibi farklı safsızlıklar bulunabilir. Ticari olarak üretilen veya saflaştırılan aljinatlar vücut içerisinde kullanıldığında istenilmeyen bir tepki görülmemiştir. Aynı zamanda mannuronik (M) asit oranı yüksek olan aljinatın, guluronik asit (G) oranı yüksek olan aljinata göre sitokin üretimini başlatmada daha güçlü olduğu belirtilmiştir (Orive vd., 2002).

2.8.2. Aljinatın kullanım alanları

Aljinat doğal polisakkarit olduğu için çok çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Tekstil sektöründe kumaş boyamasında, gıda sektöründe kıvam verici ve kozmetik sektöründe nemlendirici olarak ve doku mühendisliği uygulamaları olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır. Suda çözünürlüğünün yüksek olması ve kıvam arttırma özelliğinden dolayı aljinat kullanımı tercih edilmektedir (Roger vd., 2006).

Aljinat tekstil sektöründe kumaş boyamasında, boyaların kıvamlarının yoğunlaştırılmasında kullanılmaktadır. Kumaşın içeriğindeki selüloz aljinat ile kimyasal reaksiyona girmediği için kumaş renginde değişim olmamaktadır. Aynı zamanda aljinat kumaştan yıkama ile uzaklaştırılabilmektedir. Ekonomik olmasa bile tekstil sektöründe çok fazla tercih edilmektedir (Küçükçapraz vd., 2016).

Gıda sektöründe aljinatın kullanımı tekstil sektöründen sonra ikinci sırada gelmektedir. Kıvam arttırma özelliğinden dolayı dondurmalarda, pudinglerde, reçellerde ve mayonezlerde kullanılmaktadır. Aljinatın toksik olmaması ve kıvam arttırma özellikleri gıda sektöründe çeşitli şekillerde kullanılmasını sağlamıştır. Dondurmalarda aljinat kullanıldığında buzlanma engellenerek pürüzsüz bir dondurma üretilmektedir. Ayrıca aljinat marketlerde satılan dondurulmuş etler, meyve ve sebzeler için koruyucu malzeme olarak da kullanımı tercih edilmektedir. Gıdalara ilk olarak aljinat çözeltisi daha sonra ise CaCl_2 (kalsiyum klorür) çözeltisi püskürtülmektedir. Bu çözelti sayesinde gıdalar bozulmalara, çürümelere ve oksidasyona karşı korunarak raf ömürleri uzamaktadır (Tapia vd., 2007).

2.8.3. Aljinatın biyomedikal alanda kullanımı

Aljinat gıda sektöründe uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal kaynaklardan ve sentetik olarak elde edilebilmesi biyomedikal uygulamalarda son yıllarda kullanımını giderek arttırmıştır. Aljinattan elde edilen jellerin doku ve organların yenilenmesi ve onarımında kullanımı için araştırmalar yapıldığı bildirilmektedir (Silva ve Mooney, 2010). Biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri nedeniyle, aljinat doku mühendisliği, ilaç salınım sistemleri, yara iyileşmesi ve hücre kültürü gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan biyomalzemedir.

Yara örtüsü uygulamalarında aljinat önemli bir malzemedir. Aljinat bazlı yara örtüleri nemli bir ortam sağlayarak enfeksiyon riskini azaltmaktadır. Bu sayede doku oluşumu ve onarımını hızlandırmaktadır. Geleneksel yara örtülerine göre aljinat bazlı yara örtülerinin çeşitli avantajları bulunmaktadır. Geleneksel yara örtüleri (gazlı bezler) zararlı organizmaların yaraya bulaşmasını önler ve yarayı kuru tutmaktadır ancak aljinat bazlı yara örtüleri ise nemli ortam sağlamakta ve iyileşme çok daha hızlı olmaktadır (Queen vd., 2004). Aljinat yara örtülerini jel forma getirmek için kalsiyum iyonu kullanılarak üretilmektedir. Kuru haldeki yara örtüleri yara sıvısını emerek jel haline geri dönmektedir (Yin vd., 2015).

Kıkırdak dokunun yenilenmesi uygulamalarında aljinat detaylı bir şekilde araştırılmaktadır. Kitosan, kolajen, aljinat ve jelatin gibi biyopolimerler kıkırdak dokunun yerine kullanılabilen veya dokunun yerine geçebilen malzemelerdir. Aljinat dokulara benzer özelliği ve biyobozunur olması sayesinde kıkırdak dokunun yerine kullanılabilen doğal bir polimerdir. Kondrojenik hücrelerin hayvan örneklerinde hasarlı kıkırdağın onarımında aljinat jellerin faydalı olduğu belirtilmiştir. Yapılan ilk araştırmalarda aljinat ve kalsiyum sülfat ile bir çözelti hazırlanarak kondrosit süspansiyonu kullanılmıştır. Fare ve koyunlara deri altı implantasyon ile uygulanan *in-vivo* çalışmalarda 30 hafta süren deney sonucunda üretilen yapının korunduğu ve kıkırdak yapının oluştuğu görülmüştür. Aynı zamanda proteoglikan ve kolajen içeriği ile üretilmiş kıkırdağın elastik modülü doğal kıkırdaktakilere kıyasla yaklaşık %80 oranında olduğu bildirilmiştir (Chang vd., 2001, 2003). Aljinatın, biyoyumluluğu, biyoçözünürlüğü, hücre tutunması ve canlılığı için başarılı bir iskelet yapısı oluşturması ve ekonomik olması gibi çeşitli özellikleri sayesinde kıkırdak dokunun onarımı için potansiyeli yüksek bir biyomalzeme olarak düşünülmektedir (Venkatesan vd., 2015).

Kemik hasarlarının onarımı günümüz teknolojisine rağmen yavaş iyileşme sebebiyle sınırlıdır. Aljinat bazlı hidrojeller yeni kemik oluşumu için potansiyel bir malzeme olarak kabul edilmiştir. Vücuda küçük operasyonlar ile yerleştirilebilmeleri, hasarlı dokuları doldurabilmeleri ve kimyasal özellikleri nedeniyle aljinat bazlı hidrojeller kemik yenilenmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada kitosan/aljinat kompozit yapı iskeleti elde edilmiştir. Kompozit yapı iskeleti mekanik özelliklerde iyileşme ve yapısal kararlılık göstermiştir. Aynı zamanda yeni kemik oluşumunu ve onarımını hızlandırdığı bildirilmiştir (Li vd., 2005).

Moleküler ağırlığı düşük ilaçların verilmesinde ve ilaç salınım hızını düzenlemek için aljinat kullanımının faydalı olacağı belirtilmiştir (Boontheekul vd., 2005). Aljinat jellerin nano boyutta porları sayesinde moleküllerin difüzyonu hızlı gerçekleşmektedir. Aynı zamanda protein yapıları ilaçların salınması gerçekleşene kadar yapının korunması aljinatın kullanımını elverişli kılmaktadır. Aljinatın gözenekli yapısı ve hidrofilik yeteneği nedeniyle ilacın yapısındaki protein salınımı hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir (Lee vd., 2003).

2.9. Hidrojeller

Hidrojeller, yüksek miktarda su emme ve şişme potansiyeline sahip üç boyutlu ve çapraz bağlı polimerik yapılardır. Yumuşak ve esnek yapılarının yanı sıra çeşitli fiziksel özellikleri nedeniyle hücre dışı matrisle benzerlik göstermektedir. Bu yüzden hidrojeller biyomalzeme olarak doku mühendisliğinde, kontrollü ilaç salınım sistemlerinde, kontak lenslerde ve biyosensörler için membran olarak kullanılmaktadır (Ahmed, 2015; Sánchez-Díaz vd., 2006).

2.9.1. Hidrojellerin sınıflandırılması

Hidrojeller polimer bileşenlerine, üretim yöntemlerine, fiziksel yapılarına, iyonik yüklerine ve çapraz bağlanma türüne vb. göre sınıflandırılabilirler (Rizwan vd., 2017).

Kaynağına göre hidrojeller doğal ve sentetik olarak iki gruba ayrılırlar. Doğal hidrojeller, kolajen, jelatin, fibrin; kitosan, aljinat ve dekstran gibi doğal polimer ve polisakkaritler kullanılarak elde edilmektedir. Bu hidrojeller biyoyumluluk, biyobozunma ve düşük toksisite gibi özelliklere sahiptir. Zayıf mekanik özellikleri ve hayvan kaynaklı virüslere sebep olmaları önemli dezavantajlarındandır. Doğal hidrojeller doku mühendisliği, kırık dokuların yenilenmesi ve ilaç salınım sistemleri gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Singhal ve Gupta, 2015). Sentetik monomerler kullanılarak kimyasal polimerizasyon ile elde edilen hidrojellere sentetik hidrojel adı verilmektedir. Farklı özelliklerde üretilebilmeleri ve enfeksiyon riskini azaltmaları en önemli özelliklerindedir (Kirschner ve Anseth, 2013; Tan ve Marra, 2010).

Polimer bileşenlerine göre hidrojeller üç kategoride sınıflandırılırlar. Bunlar; homopolimer, kopolimer ve iç içe geçmiş ağ yapıları (IPN) hidrojellerdir. Homopolimer hidrojeller, sadece tek çeşit monomerden oluşan yapılardır. Monomerin yapısı ve

polimerleşme yöntemine göre çapraz bağlanmış yapıda olabilirler. Kopolimer hidrojel, en az bir tanesi hidrofilik olan iki veya daha fazla monomer çeşidinden oluşan yapılardır (Yang vd., 2002). İç içe geçmiş ağ yapısına (IPN) sahip hidrojel ise çapraz bağlı iki bağımsız sentetik veya doğal polimerden oluşan yapılardır. IPN hidrojin yapısını oluşturan hidrojellerden bir tanesi çapraz bağlanmış değilse bu yapıya yarı IPN hidrojel denilmektedir (Hacker ve Mikos, 2010; Maolin vd., 2000).

Fiziksel yapılarına göre hidrojel, amorf, yarı kristal ve kristal olmak üzere üç kategoride incelenir. Amorf yapıya sahip hidrojelde rastgele makromolekül zincirleri bulunmaktadır. Yarı kristal yapıya sahip hidrojel ise hem amorf hem de kristalin yapıda polimerler bulundurulur. Kristalin yapıya sahip hidrojel ise düzenli makromolekül zincirlerinin dağılım gösterdiği hidrojellerdir (Rizwan vd., 2017).

İyonik yüklerine göre hidrojel anyonik, katyonik, nötral ve amfoterik olmak üzere dört kategoride sınıflandırılmaktadır. Katyonik hidrojel, pozitif yüklü iyon içeren hidrojellerdir. Bu hidrojel asidik ortamlarda iyonlaştıklarından dolayı elektrostatik itme kuvveti artmaktadır. Bu yüzden asidik ortamlarda katyonik hidrojel yüksek şişme değerlerine sahip olmaktadır (Singhal ve Gupta, 2015). Anyonik hidrojel yapısında negatif iyonları içeren hidrojellerdir. Yüksek pH değerlerinde iyonlar arasındaki elektrostatik itme kuvveti arttığından dolayı yüksek şişme performansı göstermektedir (Peppas vd., 2000). Nötral hidrojel, yapısında hiçbir elektriksel yük barındırmamaktadır. Negatif ve pozitif iyonların her ikisini de yapısında bulduran hidrojel amfoterik hidrojel denilmektedir. Bu hidrojel pH değişimine karşı hassas olduklarından dolayı iyonik özellikleri de değişebilmektedir (Singhal ve Gupta, 2015).

Çapraz bağlanma çeşidine göre hidrojel; fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Hidrojelde fiziksel çapraz bağlanma hidrojen bağı, iyonik ve hidrofobik etkileşimler sayesinde gerçekleşmektedir. Kimyasal çapraz bağlı hidrojel ise kovalent bağ ile oluşmaktadır. Bu hidrojel fiziksel çapraz bağlanan hidrojellerden daha yüksek su tutma potansiyeline sahiptir (Salleh vd., 2018; Ullah vd., 2015).

2.9.2. Hidrojellerin ilaç salınımında kullanımı

Yüksek su tutma yetenekleri, biyoyumlulukları, ortam koşullarına hassaslıkları ve gözenekli yapıya sahip olmaları sayesinde çeşitli alanlarda kullanımları bulunmaktadır. Hidrojellerin en sık kullanıldığı alanlardan bir tanesi biyomedikal uygulamalardır.

İlaç salınım sistemlerinde hidrojeller ilaçların kapsüllenmesinde ve salınımında önemli bir yere sahiptir. Hidrojeller yüksek su emebilme yeteneğine sahip çapraz bağlı polimer zincir ağlarıdır. Hidrofilik olmaları, yüksek su tutma, biyoyumlu ve biyobozunur özellikleri sayesinde hidrojeller Doku Mühendisliği ve ilaç salınım sistemleri gibi biyomedikal uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda hidrojeller polimerizasyon özelliklerinden dolayı hücre ve büyüme faktörlerinin birlikte kapsüllenmesini gerçekleştirebilmektedir. Bu durumda kapsüllenmiş ilaç ve büyüme faktörlerinin kontrollü salınımı doku yenilenmesi ve büyümesi için ihtiyaç duyulan şartları sağlamış olur (Richardson vd., 2001; Yar vd., 2015).

Hidrojel yoluyla ilaç salınımı difüzyon kontrollü, şişme ve kimyasal kontrollü sistemler olmak üzere üç farklı yöntemle gerçekleşebilir. Difüzyon kontrollü ilaç salım sistemleri en yaygın kullanılan yöntemdir ve Fick difüzyon yasasına dayanmaktadır. Hidrojellerin gözenekliliği ve gözenek boyutu hidrojellerin difüzyon katsayısı ile ilişkilidir. İlaç salınım hızı şişme oranından fazla olursa ilaç iletimi şişme kontrollü sistem ile izlenir. Bunun sonucunda su emildikten sonra ilaç salımı gerçekleşir (Rizwan vd., 2017).

Şişme kontrollü ilaç iletimi, ilacın difüzyon hızı hidrojelin şişme hızından fazla olduğunda gerçekleşir. Kuru hidrojellerin hidrasyon sırasında şekil değişikliği ve ağırlık artışına gösterdiği direnç ilaç salınım hızını kontrol altında tutar. Hidrojel su veya farklı çözeltilerle temas ettiğinde yapısına su girişi sağlanır. Su girişi hidrojelin yapısında bulunan polimer zincirlerinin gevşemesine ve şişme olayının başlamasına neden olmaktadır. Şişmenin başlamasının ardından ilacın kontrollü salınımı gerçekleşmektedir (Lin ve Metters, 2006).

Üçüncü yöntem olan kimyasal kontrollü salınım, ilaç salınım matrisinde gerçekleşen reaksiyonların meydana geldiği sistemlerdir. En çok kullanılan tepkimeler, polimer zincirlerinin hidrolitik veya enzimatik bozunması veya ilaç ve polimer ağ arasında dönüşümlü/dönüşümsüz reaksiyonlardır. Uygun şartlar sağlandığında, ilaç salınım hızı hidrojellerin yüzey veya bütün aşınması kontrol edilebilmektedir. Kimyasal kontrollü

salım yöntemi ilaç salınımında gerçekleşen kimyasal tepkimelere göre sınıflandırılır (Lin ve Metters, 2006).

2.10. İlaç Yüklü Biyomalzeme Uygulamaları

Bakteri, mantar gibi çeşitli organizmalar kemik enfeksiyonuna neden olmaktadır ve sebep olduğu hastalıklar ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Kemik enfeksiyonların tedavisi oldukça zordur ve yetersizdir. Mevcut tedavi yöntemlerinin aksine biyomalzemeler sayesinde enfekte bölgeye uygulanan ilaç taşıyıcı sistemler günümüzde oldukça ilgi görmektedir. Kemik enfeksiyonu tedavisi için içerisine çeşitli antibakteriyel ajanlar veya antibiyotik ilaçların entegre edildiği biyomalzeme çalışmaları bildirilmektedir (Ucak vd., 2020).

Kemik çimentosuna antibiyotik ilaç eklenerek enfeksiyon tedavisinde kullanılması umut verici bir çalışma olarak görülmektedir. Yapılan çalışmada uzun kemiklerin enfeksiyon tedavisinde kemik dolgu malzemesi ile karıştırılan antibiyotiklerin enfekte bölgeye direkt verilmesi sayesinde enfeksiyonun erkenden bastırıldığı, tekrarlayan enfeksiyon riskinin azaldığı, iyileşmenin daha hızlı gerçekleştiği ve kemik yenilenmesi için uygun ortam şartlarının oluşmasında etkili olduğu kanıtlanmıştır (Mauffrey vd., 2016; G Wang vd., 2021). Antibiyotik yüklü Poli-metil metakrilat (PMMA) kemik çimentosunda en yaygın kullanılan malzemelerdendir. Antimikrobiyal ajanların salınması amacıyla PMMA geniş yüzey alanı sayesinde ilacın yüksek konsantrasyonunu koruyarak hastada yan etki oluşmasını önlemektedir (Lalidou vd., 2014). Gerçekleştirilen bir çalışmada kemik enfeksiyonuna sahip 30 hastaya PMMA'dan yapılan skafoldlar implante edilerek sonuçlar sistemik tedavi ile karşılaştırılmıştır. PMMA'dan yapılan iskelelerin implante edildiği hastalarda, sistemik tedavi gören hastalara göre enfeksiyonun daha hızlı iyileştiği ve tekrarlanma riskinin azaldığı bildirilmektedir (Wassif vd., 2021). Avantajlarının yanında PMMA biyobozunur olmayan bir malzeme ve vücuttan çıkarılması için cerrahi bir operasyon gerektirme gibi dezavantajlarına sahiptir. Kontrollü ilaç salınımı kapsamında biyobozunur doğal polimerler ve biyoçözünür kalsiyum fosfat seramikleri ve bunların kompozit skafoldlar önem arz etmektedir (Anugraha vd., 2019; Dorati vd., 2017; Maier vd., 2013)

Biyoseramik temelli skafoldlar kontrollü bir şekilde ilaç salınımını gerçekleştirmenin yanı sıra kemik yenilenmesini teşvik etmektedir. Hidroksiapatit, kalsiyum fosfat ve trikalsiyum fosfat gibi biyoseramikler kemiğin inorganik yapısına benzedikleri için

kemik yenilenmesi için en sık kullanılan malzemeler (Lew vd., 2012; M. Stevens, 2008). İlaç salınım hızını kontrol etmek ve osteogenezi teşvik etmek için biyoseramiklere antibakteriyel ilaçların yüklenmesi önemli uygulamalar arasındadır. Yapılan bir çalışmada *S. aureus* bakterisinin neden olduğu kemik enfeksiyonunu tedavi etmek amacıyla antibakteriyel ilaç yüklenmiş çimento formunda enjekte edilebilir kalsiyum fosfat kullanılmıştır (Inzana vd., 2016). İlaç yüklenmiş kalsiyum fosfat çimentosu sayesinde enfeksiyonlu bölgeye antibakteriyel ilaç doğrudan verilebildiği için enfeksiyon kolaylıkla bastırılabilen ve gözenekli yapıları nedeniyle mükemmel biyoaktivite özelliği gösterdikleri belirtilmektedir (Ginebra vd., 2018).

Zhou ve arkadaşlarının 2018 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmada jelatin ve β -trikalsiyum fosfat içeren skafoldlar üretilmiş ve antibiyotik bir ilaç olan Vankomisin yüklenmiştir. Antibiyotik yüklü skafoldlar tavşanların kaval kemiğine implante edilerek *in-vivo* testleri gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonuçları, ilaç yüklü skafoldların enfeksiyonu kontrol altına alarak kemik onarımı için Vankomisin salınımını 8 hafta süresince devam ettirdiği bildirilmektedir (Zhou vd., 2018).

Kemik enfeksiyonunun doğrudan tedavisi için hidroksipropil metilselüloz (HPMC) mikro partikülleri ve kitosan ile hazırlanan hidrojele Vankomisin ilacı yüklenmiştir. Hazırlanan bu hidrojin Vankomisin salınımını geciktirebildiği bildirilmektedir (Mahmoudian ve Ganji, 2017). Başka bir çalışmada ise gentamisin ilacı yüklenmiş enjekte edilebilir PLGA (poli(laktik-ko-glikolik)asit) nanopartiküller (NP) üretilmiş ve bir polisakkarit olan gellan zıncı hidrojin içerisine entegre edilerek daha az cerrahi müdahale gerektiren enjekte edilebilir formda üretilmiştir. Bu hidrojel cerrahi müdahaleleri minimize etmesinin yanı sıra enfeksiyonlu bölgede ilaç salınımının kontrollü bir şekilde gerçekleşmesini sağlamıştır (Posadowska vd., 2016).

Antibiyotik yüklü kemik greftleri enfeksiyon tedavisinde kullanım potansiyeli olan uygulamalardan bir tanesidir. İlaç yüklü bu greftler kemik oluşumunu kolaylaştırırken enfeksiyonlu bölgeye yüksek ve etkili antibiyotik salınımını gerçekleştirebildiği belirtilmektedir (Fölsch vd., 2020). Fang ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada antibiyotik bir ilaç olan Vankomisin ve demineralize süngerimsi kemik çapraz bağlanarak bir antibakteriyel matris üretilmiştir. Bu matrisin analiz sonuçlarına göre 6 hafta süresince Vankomisin salınımına devam ettiği ve mezenkimal kök hücrelerinde ve osteoblastlarda osteogenezi arttırdığı görülmüştür. Ayrıca geliştirilen matrisin fareler

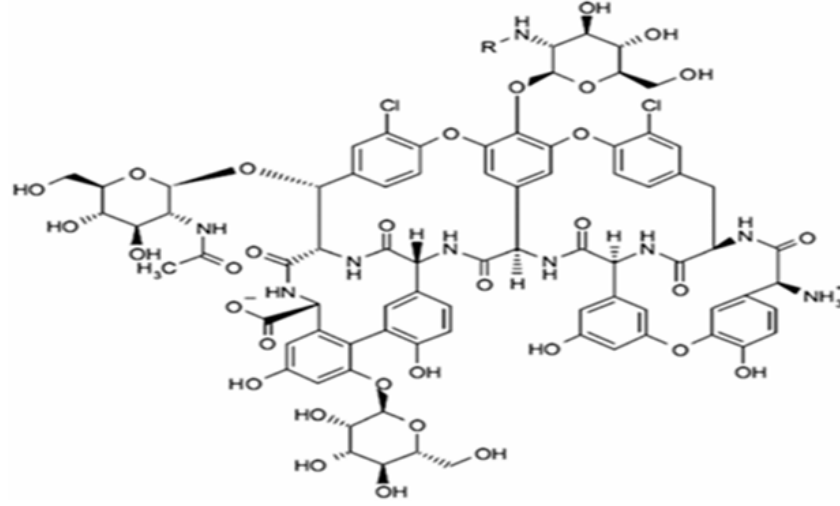
üzerine yapılan deneylerde enfeksiyonlu bölgeyi iyileştirmesiyle antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Fang vd., 2021). Diğer bir çalışmada kemik enfeksiyonuna sahip olan hastaların fibröz doku, kıkırdak ve kortikal tabakaları kullanılarak kemik greftleri üretilmiş ve Vankomisin ilacı yüklenmiştir. *In-vitro* çalışma sonuçlarına göre hazırlanan kemik greftlerinin uzun süreli kontrollü ilaç salınımını gerçekleştirmesi nedeniyle enfeksiyonun Vankomisin ilacına direnç göstermesini engellediği bildirilmektedir (Pavel vd., 2012).

Ortopedik implantların enfeksiyonlardan korunması amacıyla implantlar antibakteriyel ajanlar ile kaplanarak vücuda yerleştirilmesi kemik enfeksiyonunu önlemeye yardımcı bir yöntemdir. Antibiyotik ilaç ile kaplanan implantlar enfeksiyon riski ve olumsuz yan etkiler olmadan kontrollü ilaç salınımını uzun süreli gerçekleştirebilmektedir. Titanyum (Ti) (Liu vd., 2017), kobalt (Co) (Lin vd., 2019) ve paslanmaz çelik (Gimeno vd., 2013) gibi metaller iyi korozyon direnci, mekanik özellikleri ve biyouyumlulukları sayesinde ortopedik implantlarda sıklıkla tercih edilen malzemelerdir. Titanyum kemik enfeksiyonlarında en yaygın kullanılan metal malzemedir. Yapılan bir çalışmada titanyum metali antibiyotik bir ilaç olan Gentamisin'i taşımak amacıyla kitosan/lizin biyopolimerleri ile kaplanmıştır. Kaplanan titanyum implantı ilaç salınımı sayesinde enfeksiyonu iyileştirmenin yanında hücrelerin yapışmasını engellediği belirtilmektedir. Çalışmanın sonuçlarına göre kaplanan titanyum implantın kemik yenilenmesini ve büyümesini teşvik ettiği bildirilmektedir (Mohan Raj vd., 2018).

2.11. Teikoplanin

Teikoplanin, ciddi bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Actinoplanes teichomyceticus'tan elde edilen bir lipoglikopeptid ilaçtır. Targocid ticari ismiyle 1987 yılında piyasaya satışa çıkarılmıştır. *Staphylococcus aureus* bakterisi dahil olmak üzere gram pozitif aerobik bakterilerin sebep olduğu şiddetli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde oldukça etkilidir. Yapısal olarak bakıldığında beş glikopeptid (A2-1-A2-5) ve ufak bir hidroliz sonucu elde edilen üründen (A3-1) oluşan kompleks bir molekül yapısına sahiptir. Teikoplanin'in kimyasal yapısı Şekil 2.6.'da verilmiştir. Kimyasal yapısındaki bileşenler doğrusal bir heptapeptid aglikon, bir α -d-mannoz ve bir asetil β -d-glukozaminden oluşan birbirlerine benzer glikopeptid yapısından oluşmaktadır. (Marrubini vd., 2019; Passoni ve Salgado, 2012).

Teikoplanin, bakterilerin hücre duvarı sentezini engelleyerek etkisini gösterir. Endokardit, osteomyelit, pnömoni, sepsis, cilt ve yumuşak doku ve kemik enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Huang vd., 2020).



Şekil 2.6. Teikoplanin'nin kimyasal yapısı (Passoni ve Salgado, 2012)

Teikoplanin, benzer etkilere sahip olduğu piyasadaki diğer bir ilaç olan Vankomisin'e göre daha az nefrotoksik etkiye ve alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır bu yüzden Vankomisin'e alternatif bir antibiyotik olarak gösterilmektedir. Teikoplanin, Vankomisin ile karşılaştırıldığında daha yüksek lipofilik molekül yapısındadır ve bu durum Teikoplanin'e daha iyi bir doku ve hücre içi konsantrasyonu, dokulara daha hızlı ulaşma ve kana daha yavaş salınım gibi üstün özellikler kazandırmaktadır. Aynı zamanda Teikoplanin insan vücudundaki pH düzeyinde daha iyi bir çözünme gerçekleştirir ve bu sayede kas içi veya damar içine uygulandığında iyi bir emilme gösterir. Damar yoluyla veya kas içine uygulanabildiği için kronik kemik enfeksiyonu gibi uzun süreli damar yolu tedavisi gereken durumlarda kullanım kolaylığı sağlamaktadır. 168 saatlik yarı ömre sahip olan Teikoplanin'nin günde bir doz uygulanması yeterlidir (Murray vd., 2014).

2.11.1. Teikoplanin'nin kullanıldığı uygulamalar

Teikoplanin, *S.aureus* gibi gram pozitif bakterilerin neden olduğu ciddi bakteriyel enfeksiyonlara karşı güçlü etkiye sahip olduğu için kronik kemik enfeksiyonlarında yaygın olarak tercih edilen önemli bir antibiyotik haline gelmiştir. Uzun yarı ömre sahip olması günde bir kez uygulanmasını yeterli kılmıştır. Bu sayede hem hasta hem de tedavi aşaması için kullanım kolaylığı sağlanmış olur. Bu gibi çeşitli özellikleri sayesinde literatürde Teikoplanin'nin kronik kemik enfeksiyonu tedavilerinde uygulama örnekleri bulunmaktadır (Marrubini vd., 2019; Passoni ve Salgado, 2012).

Yapılan bir araştırmada osteomyelit tedavisi için standart antibiyotik tedavisinin yan etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla antibiyotik yüklü biyobozunur ilaç taşıyıcı hidrojel geliştirilmiştir. Geliştirilen bu ilaç salınım sistemi, polietilen glikol monometil eter (mPEG) ve polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) kopolimerinden oluşan sıcaklığa duyarlı biyobozunur bir hidrojelden oluşmaktadır. Osteomyelit tedavisinde mPEG-PLGA bazlı biyolojik olarak parçalanabilir hidrojellerin kullanımı; kolay hazırlanabilmesi, entegre edilen teikoplaninin sürekli salınım yapabilmesi, enjekte edilebilir formda olması ve enfeksiyon olan dokuda jelleşmenin başlaması gibi çeşitli avantajlar sağladığı bildirilmektedir. Tavşanlar üzerinde deney yapılan bu hidrojellerin osteomyelit tedavisinde Teikoplanin salınımının başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek tedavinin etkili olduğu belirtilmektedir (Peng vd., 2010).

Osteomyelit tedavisi için diğer bir yaklaşım ise biyoaktif cam malzemelerin ilaç taşıyıcısı olarak kullanımınıdır. Tavşanlar üzerinde gerçekleştirilen deneylerde borat ve biyoaktif cam malzemedeki üretilen implanta Teikoplanin entegre edilmiştir. Bu implantın amacı enfekte olmuş dokuya yerinde Teikoplanin salınımı gerçekleştirerek o bölgeyi iyileştirmektir. Araştırma sonuçlarına göre Teikoplanin yüklü implant, damar içine uygulanan Teikoplanine göre osteomyelit tedavisinde daha başarılı olduğu görülmektedir (Jia vd., 2015). Drago ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, osteomyelit tedavisi için biyoaktif cam granüllerinin etkisini öğrenmek amacıyla 27 hasta üzerinde enfekte bölgeye yerleştirilerek bir araştırma yapılmıştır. Granüller enfekte bölgeye koyulduktan sonra antibiyotik yüklenmese bile hiçbir yan etki göstermeden osteomyelite sebep olan bakterilere karşı etkili olduğu belirtilmektedir (Drago vd., 2013)

Bir diğerk çalışmada Teikoplanin ve Gentamisin entegre edilen insan kemiğinin sadece enfekte dokuya ilaç ileticisi olarak bakterilere karşı etkisi araştırılmıştır. Kalça protezi yerleştirilen yedi hastanın kemiklerinden alınan örnekler bu çalışmada kullanılmıştır. Elde edilen örneklerin bir kısmı Teikoplanin, diğerk kısmı ise Gentamisin içerisinde 1 saat bekletilmiştir. Sonuçlara göre insan kemiğinin elverişli şartlarda Teikoplanin ile bütünleştiği ve 14 gün süresince etkili seviyede antibiyotik salınımını gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Kazimoglu vd., 2008).

Kalsiyum ve fosfor açısından oldukça zengin olan biyoaktif cam biyomalzemeler (BG) kullanılarak kemik onarımı için poroz yapıda skafold geliştirilmiş ve Teikoplanin'nin salınımı üzerine bir araştırma yapılmıştır. Biyoaktif camların biyoaktivitelerini arttırmak amacıyla sol-jel metodu kullanılarak bor ilavesi gerçekleştirilmiştir. Bor katkısı yapılmış BG'ler doku yenilenmesi üzerinde önemli etkilere sahip oldukları belirtilmektedir. Sonuçlara göre bor katkılı BG'lerin nano boyutta porlara ve oldukça przli bir yapıya sahip olduğu ve bu durumun ilaç salınım sistemi için faydalı olduğu bildirilmektedir. Bor katkılı BG'ler ilaç salınım sistemi için potansiyeli olan biyomalzemeler olduğu görülmektedir (Huang vd., 2020).

Antibiyotik entegre edilmiş nanofiberler, yara iyileşmesi ve enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Amiri ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Teikoplanin'nin hedef dokuya iletilmesi ve doku iyileşmesi amacıyla kitosan-polietilen oksit (PEO) nanofiberlerden ilaç salınım sistemi geliştirilmiştir. Kitosan- polietilen oksit nanofiberlere %2 ve %4 oranında Teikoplanin yüklenmiştir. Bu nanofiberlerin 12 gün boyunca Teikoplanin salınımı gerçekleştirdiği ve yapılan antibakteriyel analizde Tekoplanin'in enfeksiyonları önleyerek bu özelliğini arttırdığı belirtilmektedir. Aynı zamanda sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde %4 Teikoplanin entegreli nanofiberlerin yara iyileşmesinde başarılı olduğu ve bu nanofiberlerin kullanımının güvenliği ve etkinliğinin onaylandığı bildirilmektedir (Amiri vd., 2020).

Kemik enfeksiyonlarının tedavisinin başarılı olması için antibiyotik ve doku oluşumunu sağlayan osteoindüktif özelliklerin taşınmasını sağlayabilen ilaç salınım sistemleri kullanılmasının önemli olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmada, osteomyelit tedavisinde kullanılmak amacıyla pH'a duyarlı ipek fibroin (SF) ve sodyum aljinattan oluşan hidrojel skafoldlar geliştirilerek Teikoplanin ve fenamil yüklenmiştir. Bu hidrojellerden Teikoplanin ve fenamil salınımı devamlı ve pH'a duyarlı bir şekilde

gerçekleşmiştir. 35 gün süresince Teikoplanin'nin üç değişik pH'ta (5.5, 7.4 ve 8.5) antibakteriyel etkinliğine devam ettiği belirtilmektedir. Diğer hidrojellere göre geliştirilen Teikoplanin yüklü bu hidrojeller, *S.aureus* bakterisinin neden olduğu enfeksiyonlu kemikte daha az enfeksiyon ve daha yüksek yenilenme olduğu bildirilmektedir. Sonuçlara bakıldığında Teikoplanin ve fenamil yüklü hidrojellerin kemik enfeksiyonlarının tedavisinde potansiyeli olan bir sistem olduğu düşünülmektedir (Motasadizadeh vd., 2022).



3. BÖLÜM

MALZEME VE METOT

3.1. Malzemeler

Kalsiyum nitrat tetra hidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve diamonyum hidrojen fosfat ($(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{HPO}_4$) (Merck, Almanya); %99,9 saflıktaki etanol (Fluka, Almanya); amonyak ve aljinat (Isolab, Almanya) kimyasalları HA sentezi için tedarik edilmiştir. Kırık beyaz renkteki mikronize doğal pomza numunesi BC Teknoloji Danışmanlık ve İmalat firması (Kapadokya Teknopark, Nevşehir) aracılığıyla temin edilmiştir. Deneylede Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (NEVÜ-BTUAM) tarafından sağlanan ultra saf su kullanılmıştır.

3.2. Sol-Jel Yöntemi ile Hidroksiapatit Üretimi

Koçak tarafından uygulanan protokol üzerinde ufak değişiklikler yapılarak saf hidroksiapatit nanopartikülleri üretimi gerçekleştirilmiştir (Kocak, 2021). Sol-jel yöntemi ile hidroksiapatit nanopartiküllerinin sentezinde 70°C 'ye ısıtılan ve reaksiyon bitene kadar da bu sıcaklıkta sabit kalacak üç boyunlu ceketli bir ısıtıcıda gerçekleştirilmiştir. Stokiyometrik ($\text{Ca}/\text{PO}_4:1,667$) bir reaksiyon için $0,5 \text{ M Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $0,3 \text{ M } (\text{NH}_4)_2 \cdot \text{HPO}_4$ kimyasallarının öncü çözeltileri sırasıyla eşit hacimdeki etanol ve de-iyonize su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Çözeltilerin pH değeri amonyak kimyasalı ilavesi ile $10,5$ olarak ayarlanmıştır. Kalsiyum çözeltisi üzerine fosfat öncü çözeltisinin damla damla ilavesi ile reaksiyon başlatılarak düzenli aralıklarla amonya ilavesi gerçekleştirilerek pH değeri 10 'a ayarlanarak sabit kalması sağlanmıştır. Üç saat boyunca reaksiyon gerçekleştirildikten sonra çözelti 15 dakika dinlendirilip vakumlu filtrasyon ile filtre edilmiştir. Daha sonra yan ürünleri uzaklaştırmak ve pH değerini nötralize etmek amacıyla de-iyonize su kullanılarak yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Ardından hidroksiapatit çökeltisi petri kabına alınarak 100°C 'de 24 saat kurutulmuş ve havanda öğütülerek toz halinde elde edilmiştir.

3.3. Sol-Jel Yöntemi ile Pomza Katkılı Hidroksiapatit Üretimi

Doğal Nevşehir yöresi mikronize pomzası biyomedikal uygulamalar için saflaştırılarak 150 mikron elekten geçirildikten sonra bu çalışmada kullanılmıştır. Hidroksiapatitin sol-jel yöntemi ile üretimi sırasında pomza ilavesi yapılarak bileşenlerin moleküler düzeyde etkileşimi sağlanmıştır. Pomza katkılı hidroksiapatitin sentezine ait fotoğraflar Şekil 3.1'de gösterilmiştir. %7,5 oranında pomza katkısı kalsiyum öncü çözeltisi içerisine toz olarak eklenmiş 30 dk karıştırılarak süspansiyon oluşturulmuştur. Çözeltinin ilk pH değerinin ayarlanması sonrasında reaktöre alınan çözelti üzerine fosfat öncü çözeltisinin damla damla ilavesi yapılmıştır. Sonraki adımlar saf HA sentezi ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tamamlandığında 100°C'de 24 saat kurutma sonrası PM katkılı HA tozları 1100°C sıcaklıkta 3 saat kapaklı alümina kroze içerisinde sinterlenmiştir.



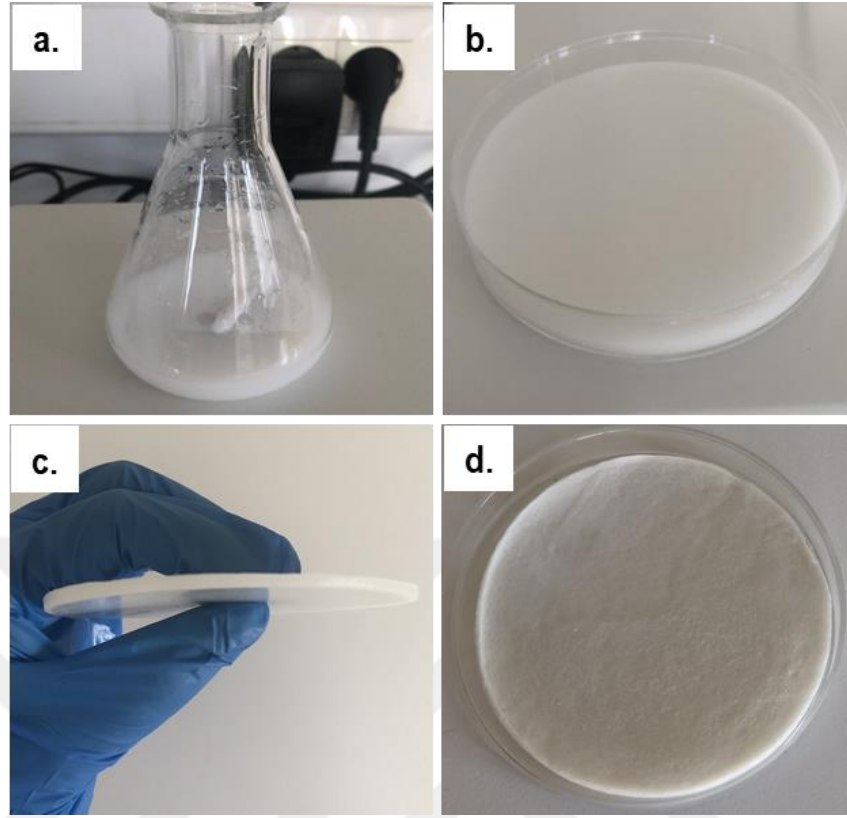
Şekil 3.1. PM katkılı HA sentezine ait fotoğraflar: (a) Üç boyunlu reaktör içerisinde 70 °C'de karıştırılan solüsyonların reaksiyonu, (b) filtrasyon ve yıkama işlemine ait görüntü, (c) reaksiyon tamamlandıktan sonra gerçekleştirilen filtrasyon ve yıkama işlemleri sonrası elde edilip 100 °C'de 24 saat kurutulmuş örnek havanda öğütülürken görüntüsü

3.4. Aljinat Matrisli Kompozit Skafoldların Sentezi

Aljinat matrisli saf HA ve PM katkılı HA entegre edilmiş kompozit poroz skafoldlar *freeze-gelation* ve *freeze-drying* teknikleri birlikte kullanılarak sentezlenmiştir. Numune isimleri ve uygulanan işlemler Tablo 3.1’de verilmiştir. Şekil 3.2’de sentez aşamalarındaki aljinat matrisli PM katkılı HA skafoldların formları gösterilmiştir. Öncelikle, 10 mM sodyum sitrat bileşiği (dağıtıcı) 20 mL de-iyonize suya eklenerek manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılarak çözülmüştür. Daha sonra 0,5 g HA (1100°C’de sinterlenmiş) ve %7,5 Pm katkılı HA (1100°C) seramik partiküller dağıtıcı ilaveli sulu çözeltiye eklenerek 30 dk karıştırılmıştır. Elde edilen dispersiyon içerisine %3,75 (w/v) konsantrasyonda bir polimer solüsyonu elde etmek için 0,75 g aljinat eklenerek 2 saat boyunca karıştırma yoluyla çözülmesi sonucu homojen bir çözelti elde edilmiştir. Bu solüsyon bir petri kabına dökülerek parafilm ile kapatılarak buzdolabında 1 saat beklettikten sonra -20°C’deki dondurucuda 24 saat bekletilmiştir. Dondurulmuş skafoldların üzerine çapraz-bağlayıcı tuz olarak 1M’lık, 10 ml CaCl₂ çözeltisi eklenerek 20°C’deki dondurucuya geri konulmuştur. 24 saat sonra skafoldlar pH değerini nötralize etmek için sırasıyla %70 ile %50 etanol ve saf deiyonize su ile ikişer kez 10 dk döner tabla üzerinde (50 rpm hız) yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra skafoldlar -20°C’deki dondurucuda 2 saat dondurulduktan sonra -80 °C’deki dondurmali kurutucuda 24 saat kurutularak poroz skafoldlar elde edilmiştir. Kurutulan Alg-PM-HA skafoldlar 6 mm çapındaki metal numune kesiciler ile kesilerek analizler için küçük diskler halinde hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. Deney numunelerinin isimleri ve uygulanan işlemler tablosu

Numune Adı	Numune Simgesi	Uygulanan İşlem
CI	Alg	Saf Aljinat Matrisli Skafold (Sodyum sitratsız)
CII	Alg-SC	Saf Aljinat Matrisli Skafold (Sodyum sitratlı)
CIII	Alg-SC-HA	Aljinat matrisli HA Skafold (1100°C’de sinterlenmiş)
SI	Alg-SC-HA-PM	Aljinat matrisli, %7,5 Pm katkılı HA (1100°C’de sinterlenmiş toz) Skafoldlar
SII	Alg-SC-HA-PM-TEC	İlaç (Teicoplanin) yüklenmiş Aljinat matrisli %7,5 Pm katkılı HA (1100°C’de sinterlenmiş) Skafold



Şekil 3.2. Alg-HA-PM skafoldların *freeze-gelation* yöntemi ile sentez aşamaları; (a) %7,5 PM katkılı HA (1100°C) seramik partikül dispersiyonuna Alg eklenerek karıştırılması (b) elde edilen Alg-HA-PM solüsyonu petri abı içerisinde (c) -20 C'de dondurma sonrasında ıslak formdaki hidrojel (d) Alg-HA-PM skafoldların dondurmalı kurutma sonrası poroz katı formu

3.5. Aljinat Matrisli Kompozit Skafoldlara İlaç Yüklenmesi

Hazırlanan kompozit skafoldların üzerine Teikoplanin etken maddesi, ticari adıyla Targocid, ilaç yüklemesi yapılarak ilaç salınım etkinliği üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bunun için 180 mg Teikoplanin etken maddeli Targocid ilacı 3 mL fosfat tampon solüsyonu (PBS) içerisinde çözündürülerek 60 mg/ml Targocid yani 50 mg/ml Teikoplanin ilaç çözeltisi elde edildi. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak seyreltildi ve PBS ile 6 mL'e tamamlanarak 20,83 mg/mL Teikoplanin anlamına gelen 25 mg/ml Targocid çözeltisi elde edilmiştir. Hazırlanan ilaç solüsyonu her bir skafold numunesinde (6mm çap) yaklaşık 2,1 mg Teikoplanin olacak şekilde 100 µL'lik solüsyon olarak eklenmiştir. 24 saat boyunca bekletilerek skafold içerisine ilacın tam emilimi sağlanmıştır. Ardından ilaç yüklü skafoldlar oda sıcaklığında 24 saat kurutularak elde edilmiştir (Ucak vd., 2020).

3.6. Karakterizasyon Çalışmaları

Kompozit skafold numunelerin kimyasal, morfolojik, termal ve biyolojik özellikleri çeşitli teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. XRD (X-Işını Kırınımı) ve TGA/DTA (Termogravimetrik Analiz/ Diferansiyel Termal Analiz) Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi BTUAM ve F-TIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) Spektroskopi analizleri Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Kimya Bölümü; SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve EDX (Enerji Dağılımı X-Işını) analizleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (TAUM); Antibakteriyel testler Eskişehir Teknik Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı birimlerinde; biyoaktivite ve şişme analizleri Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü Laboratuvarında; Biyouyumluluk testleri ise yurtdışı iş birliği kapsamında Polonya'da gerçekleştirilmiştir. Verilerin grafiğe geçirilerek çizimi ve istatistiki analizleri GraphPad Prism (Sürüm 7.0, San Diego, CA, ABD) programında gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. XRD analizleri

XRD analizleri Rigaku markasına ait Miniflex 600 model X-Işını Difraktometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler Cu-K ışığı kullanılarak 10°/dk hızında, 0.02°'lik adım genişliğinde ve 5°-90° tarama aralığında, 2-teta değer aralığında yapılmıştır. Numunelerin X-ışını kırınım deseni sağlandıktan sonra kalitatif analizler yapılarak ICDD kartlarında bulunan referanslar ile karşılaştırma ile fazlar belirlenmiştir.

3.6.2. TGA/DTA analizleri

TGA/DTA analizleri Shimadzu markasına ait TG DTA 60 model cihaz ile yapılmıştır. Oda sıcaklığından 1000 °C'ye kadar 10 °C/dk ısıtma hızı ve inert atmosfer gazı olarak azot (N₂) varlığında gerçekleştirilmiştir.

3.6.3. SEM ve EDX analizleri

SEM ve EDX analizleri Zeiss marka Gemini 500 model cihazında gerçekleştirilmiştir. SEM analizi gerçekleştirilmeden önce örneklerin yüzeyleri 45 Å kalınlıkta Au:Pd (80:20) ile kaplanmıştır. Görüntüler 3 kV voltajda ve 250-5.000 büyütme oranları arasında büyütülerek elde edilmiştir. Haritalama tekniği yardımıyla EDX analizinde elementel dağılım haritaları ve grafikleri elde edilmiştir.

3.6.4. FT-IR analizleri

Skafoldların FT-IR analizleri Pelkin Elmer marka Spektrum 100 model cihaz ile gerçekleştirilmiştir. 400-4000 cm⁻¹ dalga boyunda ATR yöntemi kullanılarak 4 tarama sonrası spektrumlar elde edilmiştir.

3.6.5. İlaç salınım çalışmaları

İlaç yüklü skafoldlar ile ilaçsız kontrol numuneleri 10 mL fosfat tampon solüsyonu (PBS) içeren tüplere yerleştirilerek çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 7 günlük süreçte 100 rpm orbital çalkalama hızında inkübe edilmiştir. Salınan ilacın ölçümleri önceden belirlenmiş zaman dilimlerinde (1, 3, 6, 24, 48, 72 ve 168 saat) yapılmıştır. Her ölçüm süresinde 5 ml elüsyon alınarak taze PBS ile değiştirilerek numuneler inkübe edilmeye devam edilmiştir. Alınan 1 mL elüsyon çözeltinin absorbans ölçümleri UV-Vis Spektrofotometresinde 280 nm'de üç tekrarlı olarak gerçekleştirilip ortalama değerler hesaplanmıştır. Ayrıca sabit miktarda artan çeşitli konsantrasyonlarındaki (20-80 µg/mL) standart ilaç çözeltileri hazırlanarak UV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen absorbans değerlerinin grafiğe geçirilerek birleştirilmesiyle bir standart doğru elde edilmiştir. İlaç salınım elüsyonlarının UV absorbans değerlerine karşılık gelen ilaç konsantrasyonları bu standart doğrunun denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Amiri vd., 2020; Ucak vd., 2020).

3.6.6. Şişme (sıvı absorpsiyon) testi

Her skafold numunesinin (6 mm çapında) başlangıç ağırlıkları (üç örnek tekrarlı) tartılarak W_i olarak (~0.005g) olarak kaydedilmiştir. Hazırlanan numuneler 5mL fosfat tampon çözeltisi (PBS) bulunan test tüplerine yerleştirilerek 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra numuneler 30 dk, 1, 2, 4, 6 ve 24 saat zaman aralıklarında yüzey suları uzaklaştırıldıktan sonra tekrar tartılarak ağırlıkları W_s olarak kaydedilmiştir. Şişme yüzdesi, W_i ve W_s'nin sırasıyla skafoldların başlangıç ve şişmiş ağırlıklarını temsil ettiği Denklem 3.1'e göre hesaplanmıştır (Kocak vd., 2024).

$$\text{Şişme oranı}(\%) = \frac{W_s - W_i}{W_i} \times 100 \quad (3.1)$$

3.6.7. SBF (yapay vücut sıvısı) ortamında biyoaktivite testi

Kokubo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bildirildiği gibi yapay vücut sıvısı (SBF), $36,5 \pm 1.5$ °C sıcaklıkta ve 7,4 pH'ta hazırlanmıştır (Kokubo ve Takadama, 2006). Skafold numuneleri (6 mm çap) her örnekten 3 tane olacak şekilde hazırlandı ve başlangıç ağırlıkları tartıldıktan sonra W_i (~0.005g) olarak kaydedilmiştir. Numuneler 10 mL SBF çözeltisi içeren test tüplerine koyularak 37 °C sıcaklıkta ve 70 rpm orbital sallama hızında çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha sonra her numunenin inkübasyon sıvısının belirlenen zaman aralıklarında (1, 4 ve 7 gün) pH ölçümü yapılmıştır. Skafoldlar iki kez su ve bir kez etanol (%100) ile yıkanarak yüzey suyu uzaklaştırıldıktan sonra tartılarak W_f olarak kaydedilmiştir. Bunun yanında numuneler 40 °C sıcaklıkta 2-3 saat kurutularak ağırlıkları tekrar tartılmıştır ve W_d olarak kaydedilmiştir. Kuru ağırlık oranı her numune için aşağıda verilen formülle (3.2) hesaplanmıştır (Kocak vd., 2024).

$$\text{Kuru ağırlık oranı (\%)} = (W_d/W_i)100 \quad (3.2)$$

7 gün süresince SBF içinde inkübe edilip kurutulan numuneler daha sonra SEM, EDX, XRD ve FT-IR teknikleri ile morfolojik ve kimyasal olarak analiz edilmiştir.

3.6.8. Biyoyumluluk testleri

Biyoyumluluk çalışması kapsamında biyomalzemeler ekstraktlarının sitotoksitesisi, hücre canlılığı, hücre çoğalması gibi çeşitli hücre kültürü çalışmaları normal insan fetal osteoblastlarının hücre kültürü (hFOB 1.19) kullanılarak ISO standartlarına göre iş birliği kapsamında Medical University of Lublin (Polonya)'da gerçekleştirilmiştir.

3.6.8.1. Biyomalzeme ekstraktlarının sitotoksitesisi

Biyomalzeme ekstraktlarının sitotoksik aktivitesi ISO 10993-5:2009 "Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi-Bölüm 5: İn vitro sitotoksitesite testlerine göre gerçekleştirildi. Biyomalzemelerden sıvı ekstraktlar ISO 10993-12:2012 "Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- Bölüm 12: Örnek hazırlama ve referans malzemeler" yönergelerine göre elde edildi.

Biyomalzemelerin ($n = 4$) $1,25 \text{ cm}^2/\text{ml}$ oranında kültür ortamında inkübe edilmesiyle 24 saatlik 48 saatlik bir inkübasyondan sonrası olmak üzere iki ayrı ekstrakt hazırlanmıştır. Daha sonra, ekstraktlar 96-kuyucuklu plakalarda 2×10^4 hücre/kuyucuk konsantrasyonunda ekilip aynı zaman diliminde büyütülen hFOB 1.19 kültürü üzerine

eklendi. Hücrelerin ekstraktlarla 24 saatlik inkübasyonundan sonra, canlılıkları MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, kontrol hücrelerine (test edilen biyomalzemeler olmadan inkübe edilen kültür ortamı) göre yüzde olarak verilen canlılığın ortalama değerleri olarak sunulmuştur.

3.6.8.2. Biyomalzemelerle doğrudan temas halinde hücre canlılığı

Deneyden önce, biyomalzemelerin tamamen doyurulması için kültür ortamında 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. hFOB 1.19 hücreleri doğrudan biyomalzeme disklerine ($n = 3$), 2×10^5 hücre/örnek yoğunluğunda ekilmiştir. Kontrol hücreleri polistiren plaka kuyucuklarında kültürlendi ($n = 3$). 48 saatlik inkübasyondan sonra, hücreler Canlı/Ölü Hücre Çift Boyama Kiti ile boyandı. Yeşil floresans yayan canlı hücreler ve kırmızı floresans ile boyanan ölü hücreler konfokal lazer taramalı mikroskobu (CLSM) kullanılarak mikroskobik gözlemler ile hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

3.6.8.3. Biyomalzemelerle doğrudan temas halinde hücre çoğalması

Hücre canlılığı deneyinde olduğu gibi deneyden önce biyomalzemelerin tamamen doyurulması için kültür ortamında 24 saat inkübe edilmiştir. hFOB 1.19 hücreleri doğrudan biyomalzeme disklerine ($n = 6$), 1×10^5 hücre/örnek yoğunluğunda ekildi. Kontrol hücreleri polistiren plakanın kuyucuklarında kültürlenmiştir ($n = 6$). 7 günlük inkübasyon ile hücre çoğalması sonrası hücre morfolojisi, hücre çekirdekleri (Hoechst 33342) ve sitoskeletal aktin filamentleri (Alexa-Fluor 636 Phalloidin) ile boyandıktan sonra CLSM görüntüleme tekniği ile değerlendirildi. Hücre çekirdekleri yeşil floresan, sitoskeleton ise kırmızı floresan yaymıştır.

3.6.8.4. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizlerden önce, verilerin normal dağılımı D'Agostini ve Pearson omnibus normallik testi ile değerlendirildi. Daha sonra, eşleştirilmemiş Student t-testi veya tek yönlü ANOVA testi ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi gerçekleştirildi. p değeri 0,05'in altında olduğunda, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (GraphPad Prism).

3.6.9. Antibakteriyel analizler

Numuneler Eskişehir Teknik Üniversitesi Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezinde test edilmiştir. Antibakteriyel testler, CLSI Ocak-2011 (Clinical and

Laboratory Standards Institute) Kirby–Bauer disk difüzyon tekniği ile MH (Mueller Hinton) agarda gerçekleştirilmiştir. Numunelerin antibakteriyel özelliklerini değerlendirmek için Gram-negatif *E. coli* (ATCC 25922) ve Gram-pozitif *S. Aureus* (ATCC 25923) bakterileri kullanılmıştır. Öncelikle 6 mm çapında disk şeklinde hazırlanmış poroz skafoldlar UV ile steril edilmiştir. *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri ile 0.5 McFarland standardına (1×10^8 mikroorganizma/mL) eşdeğer yoğunluğa sahip bakteri solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri solüsyonlarından 100 µl alınarak Mueller-Hinton agar üzerine yayıldıktan sonra skafold numuneleri besiyerine yerleştirilmiştir ve 35 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda numune etrafında oluşan bakteri inhibisyon zon sonuçları çapları (mm) lülmüştür.

4. BÖLÜM

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Skafoldların Kimyasal Karakterizasyonları

Hazırlanan numunelerin kimyasal analizleri FT-IR, XRD ve EDX yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. FT-IR analizleri

Üretilen dondurularak kurutulmuş CI, CII, CIII, SI ve SII numunelerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4.1.'de verilmiştir. Sonuçlara göre, sodyum sitratız saf aljinat matrisli CI numunesinin FT-IR spektrumu incelendiğinde 3250 cm^{-1} 'deki geniş tepe aljinatın hidroksil gruplarının O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Manjula vd., 2013). 1591 ve 1414 cm^{-1} dalga boyunda bulunan pikler aljinatın karboksil grubunun C=O gerilmesine atfedilmiştir (Samadian vd., 2023). 1019 cm^{-1} 'de görülen pik polisakkaritin C-O-C gerilme titreşimine ve 2926 cm^{-1} 'deki düşük şiddetli pik C-H gerilme titreşimine atfedilmiştir (Manjula vd., 2013). 813 cm^{-1} , 884 cm^{-1} ve 936 cm^{-1} 'de bulunan pikler ise aljinat yapısına ait karakteristik Na-O bağlarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Aslanov vd., 2017).

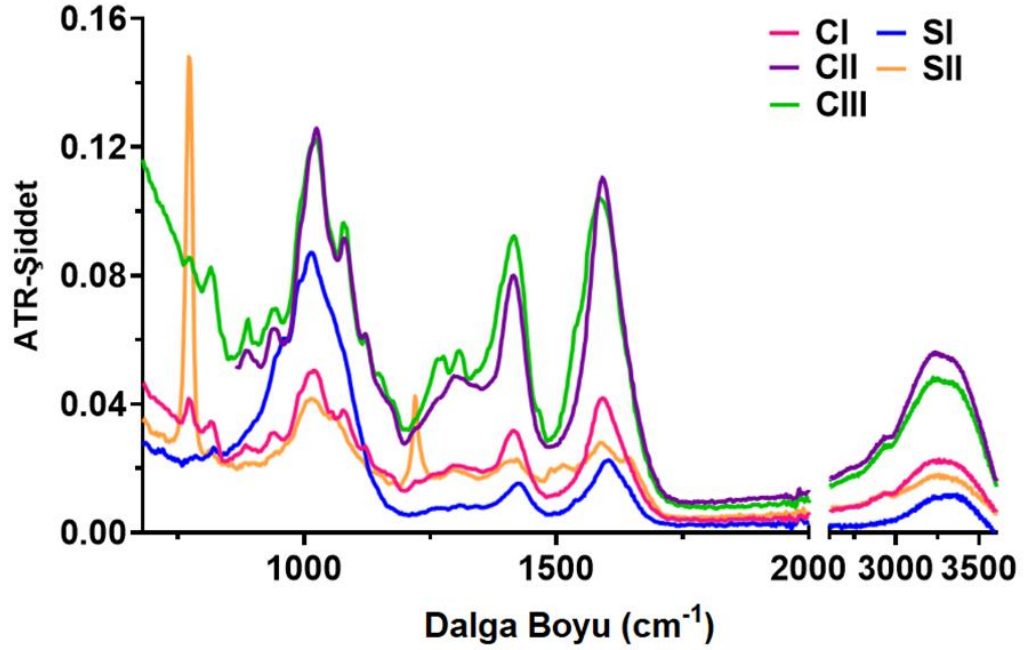
CII numunesine ait FT-IR spektrumunda görüldüğü gibi CI numunesine göre önemli bir değişiklik bulunmamaktadır yalnızca piklerin şiddetlerinin arttığı görülmektedir. Aljinatın hidroksil gruplarının O-H gerilme titreşimlerinden ve polisakkaritin C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan pikler CII numunesinde sırasıyla 3230 cm^{-1} ve 1019 cm^{-1} 'de ortaya çıkmıştır. CII numunesinde piklerin şiddetlerinin artış göstermesi literatüre göre sodyum sitrat kullanımının kalsiyum klorür ile çapraz bağlı aljinat hidrojenlerinin çözünme ve yavaş bozunma hızını arttırdığından kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (Wu vd., 2016).

CIII numunesine ait spektrumda 3283 cm^{-1} dalga boyundaki geniş pik ve 629 cm^{-1} 'deki nokta hidroksil grubunun O-H gerilme titreşimlerine atfedilmiştir (Rehm ve Bonfield, 1997; Sayed vd., 2023). 1595 cm^{-1} ve 1412 cm^{-1} dalga boylarında bulunan pikler ise aljinatın karakteristik asimetric ve simetric karboksil grubunun C=O gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır (Aslanov vd., 2017). Bu pikler aljinat matrisinde bulunan karboksil grubu ile kalsiyum klorürde bulunan (CaCl_2) çapraz bağlı kalsiyumun artı yükü (Ca^{+2}) arasındaki bağı göstermektedir (Sayed vd., 2023). 1086 cm^{-1} ve yanında bulunan

1018 cm^{-1} ve 957 cm^{-1} 'deki pikler asimetric ve simetric PO_4^{3-} grubuna atfedilmiştir (Son vd., 2012).

SI numunesine ait spektruma bakıldığında 3358 cm^{-1} dalga boyunda bulunan geniş pik hidroksil grubunun O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1602 ve 1423 cm^{-1} 'de bulunan pikler ise aljinatin karboksil grubunun C=O gerilmesine atfedilmiştir. 1014 cm^{-1} 'de görülen yüksek pik ve 960 cm^{-1} 'deki küçük pik hidroksiapatitin fosfat (PO_4^{3-}) grubuna ait olduğu belirtilir. 819 cm^{-1} ve 779 cm^{-1} 'de görülen küçük pikler ise pomzanın Si-O bağlarının eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Bang vd., 2015; Komur vd., 2016; Latifi vd., 2017; Rehm ve Bonfield, 1997).

Teikoplanin yüklenmiş SII numunesinin spektrumu ile ilgili olarak 3000-3500 cm^{-1} arasındaki geniş pik diğer numunelerde olduğu gibi hidroksil grubunun O-H gerilme ve Teikoplanin'nin neden olduğu NH_2 primer amin bükülme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Kilinç vd., 2020; Shahid vd., 2023). 1595 cm^{-1} ve 1419 cm^{-1} 'de görülen pikler Teikoplanin'nin aromatik halkalardaki C=C bükülme titreşimlerine atfedilmiştir (Kilinç vd., 2020). 1018 cm^{-1} 'de bulunan pik hidroksiapatitin fosfat grubuna ait ve 1205 cm^{-1} 'deki pik ise C-H bükülme titreşimi ise Teikoplanin'nin moleküler yapısına karşılık gelir (Amiri vd., 2020; Kahdestani vd., 2021). 550 cm^{-1} 'de görülen en yüksek pikin ise Teikoplanin'nin yapısındaki aromatik halkaların deformasyon titreşimlerinden dolayı olduğu veya polimer ve Teikoplanin arasındaki etkiden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Kahdestani vd., 2021; Kilinç vd., 2020; Sayet vd., 2014)



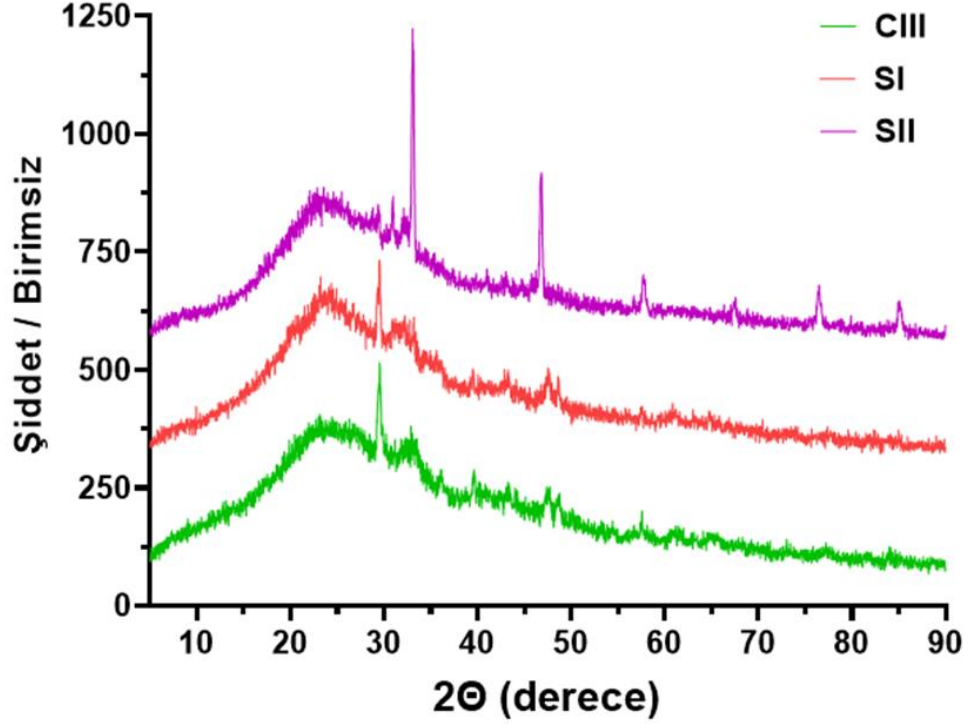
Şekil 4.1. CI (Alg), CII (Alg+SC), CIII (Alg+HA), SI (Alg+HA+PM), SII (Alg+HA+PM+TEC) numunelerine ait ATR analiz spektrumları

4.1.2. XRD analizleri

CIII, SI ve SII numunelerinin XRD grafikleri Şekil 4.2.'de verilmiştir. CIII, SI ve SII numunelerinde benzer pikler ve amorf yapıya sahip oldukları görülmüştür. Saf aljinata hidroksiapatit ilavesi yapıldığında XRD desenlerinde HA'nın kırınımları gözlemlenmektedir. CIII numunesine ait X-ışını kırınım desenlerine bakıldığında $2\theta=23,25^\circ$ 'de görülen geniş pik aljinatın amorf bir malzeme olmasından kaynaklanmaktadır. $2\theta = 34,1^\circ$ 'de bulunan en şiddetli pik ve $2\theta = 32,20, 31,52$ ve $45,67^\circ$ 'deki pikler hidroksiapatite ait karakteristik piklerdir. (Bi vd., 2019; Gholizadeh vd., 2018; Gupta vd., 2025; Iswarya vd., 2023).

SI ve SII numunelerine ait XRD kırınım desenlerine bakıldığında CIII numunesine benzer fakat ufak kaymalara sahip pikler görülmektedir. SI numunesinin XRD kırınım desenleri incelendiğinde $2\theta\approx 31,8^\circ$ 'ye yakın şiddetli bir pik bulunmaktadır ve pomza ilavesinden veya hidroksiapatitin karakteristik piklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Gupta vd., 2025; Li vd., 2010). SII numunesinin kırınım desenlerinde ise $2\theta\approx 30-35^\circ$ ve $45-50^\circ$ 'ye yakın şiddetli pikler görülmektedir. Bu piklere Teikoplanin ve hidroksiapatit piklerinin üst üste gelmesi neden olmuş olabilir. Pomza katkısı yapıldıktan sonra SI ve

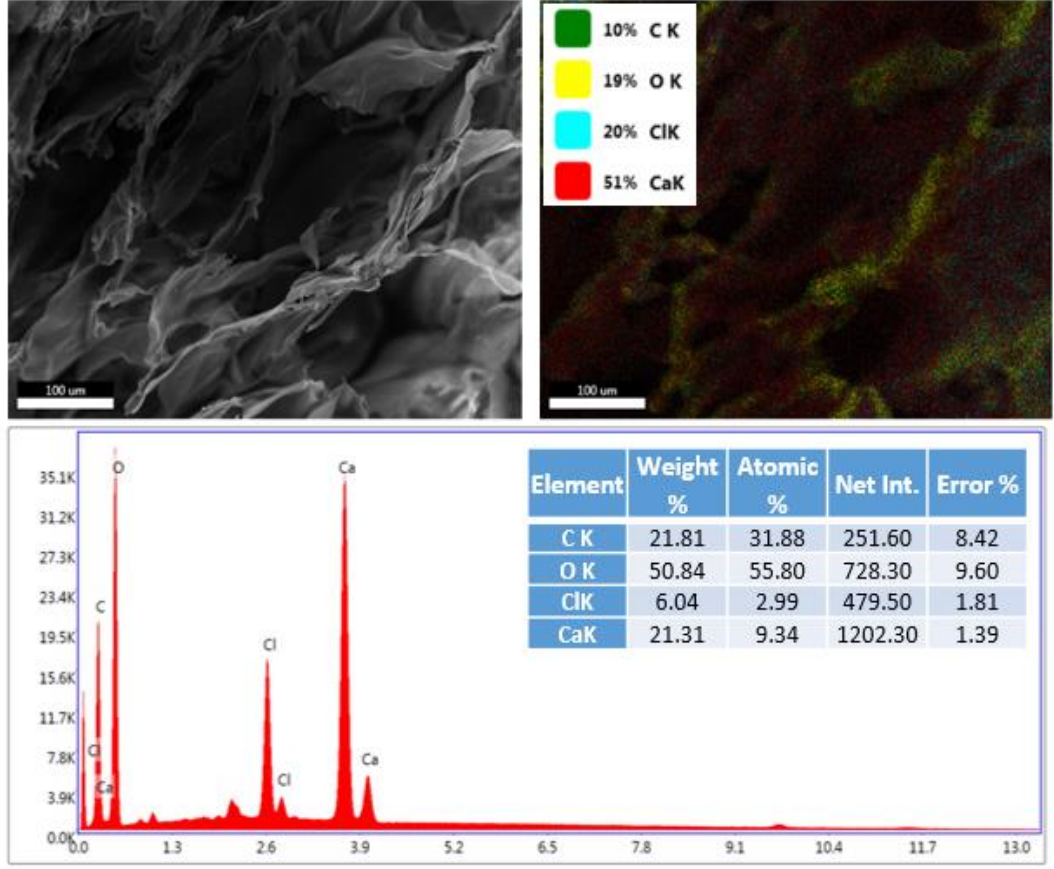
SII numuneleri temel olarak hidroksiapatitten ve ikinci faz olarak β -TCP'den oluşmaktadır (Komur vd., 2016).



Şekil 4.2. CIII (Alg+HA), SI (Alg+ HA+PM) ve SII (Alg+ HA+PM+TEC) numunelerinin XRD grafiği

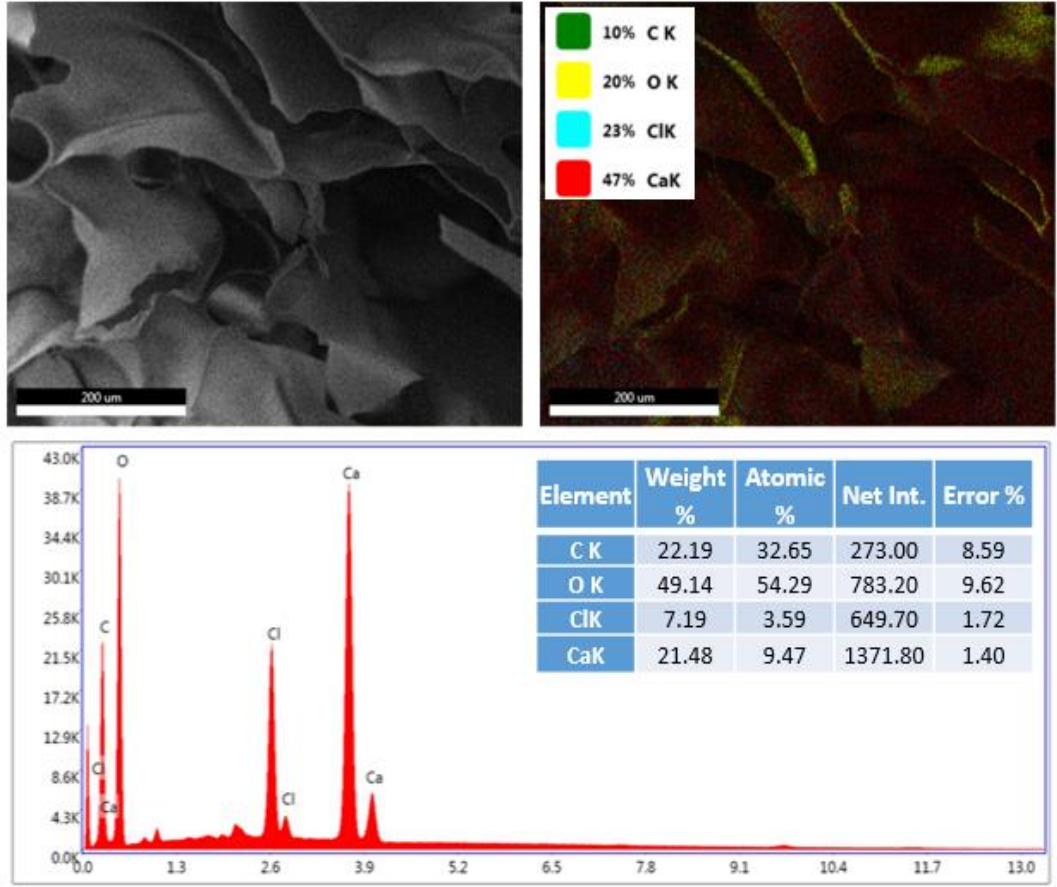
4.1.3. EDX analizi

CI - Alg matrisli skafold (sodyum sitratsız) ve CII - Alg matrisli skafold (sodyum sitratlı) numunelerine ait EDX analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre CI numunesinin yapısında %31,88 C (karbon), %9,34 Ca (kalsiyum) ve %2,99 Cl (klor) bulundurduğu tespit edilmiştir. Renkli element haritası incelendiğinde kalsiyumun temel matris olarak kırmızı renkte dağıldığını ve üzerinde oksijen, karbon ve klor elementlerinin dağıldığı görülmektedir.



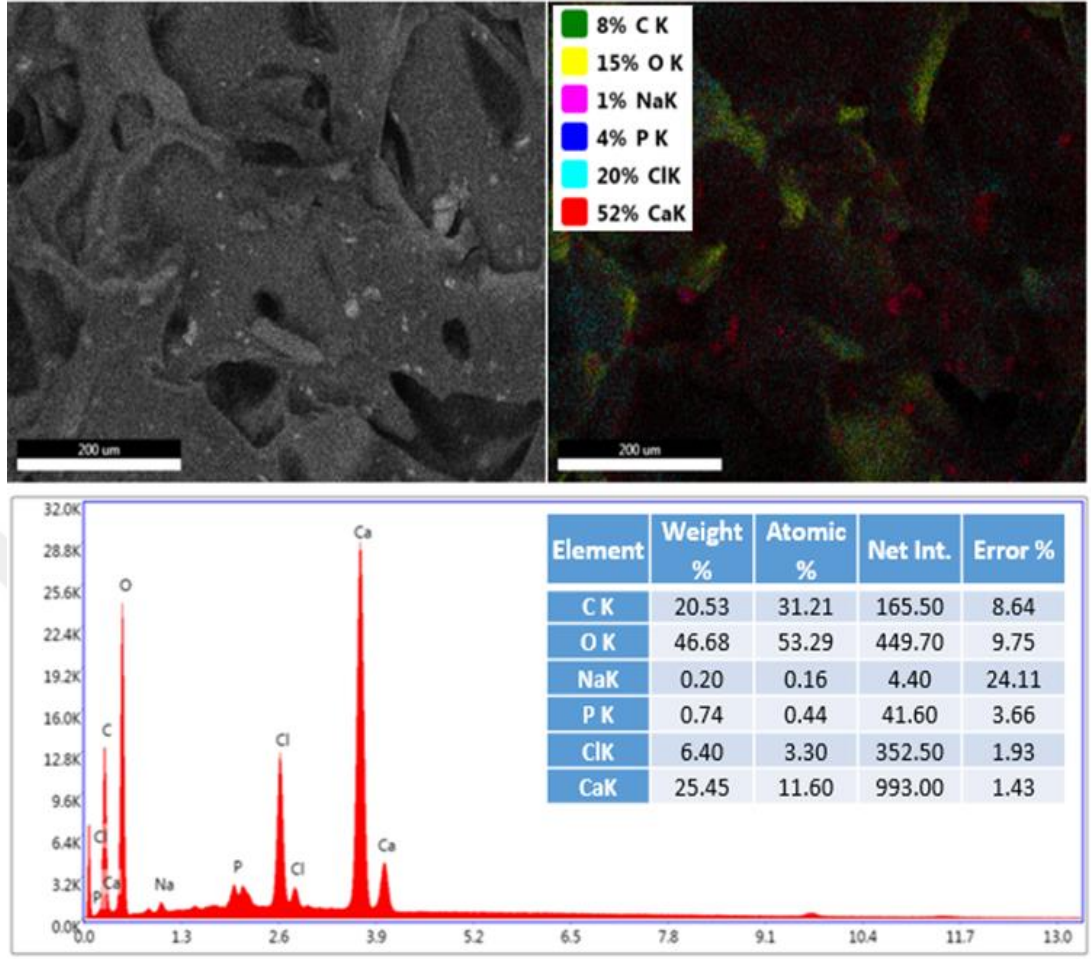
Şekil 4.3. CI-Alg matrisli skafold (sodyum sitratsız) numunesine ait EDX analiz sonuçları: SEM 'de geri saçırma yoluyla elde edilen elektron mikroskop görüntüsü (sol-üst resim), renkli element haritasını (sağ-üst resim), kimyasal elementel analiz grafiği ve element bileşim tablosu (sol-alt resim)

CII numunesinin Şekil 4.4'te verilen analiz sonuçlarına bakıldığında ise en yüksek %54,29 oranı ile oksijen bulundururken %32,65 C, %9,47 Ca ve %3,59 Cl bulundurduğu görülmüştür. Renkli element haritasına bakıldığında ise CI numunesi ile aynı şekilde kalsiyum elementinin temel matris olarak kırmızı renkte dağıldığını ve üzerinde oksijen, karbon, klor elementlerinin dağıldığı görülmektedir. CI ve CII numunelerinin her ikisinde de klor elementinin varlığının sebebi numuneler üretilirken çapraz bağlanma için CaCl_2 kullanılmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca CII numunesinde CI numunesine göre karbon elementi %0,6 oranı ile daha fazladır ve bu durumun sebebinin ise CII numunesinde bulunan sodyum sitrattan kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir.



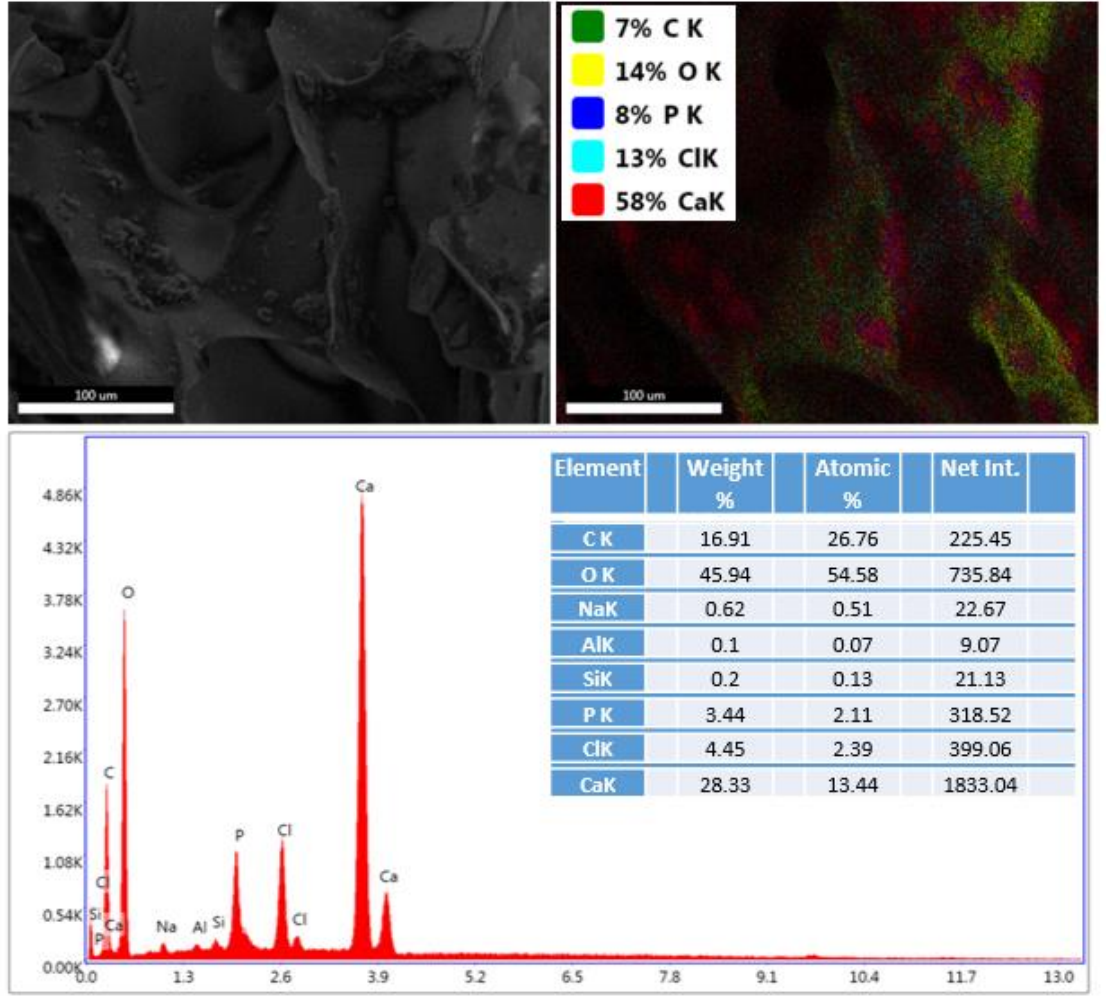
Şekil 4.4. CII-Alg matrisli skafold (sodyum sitratlı) numunesine ait EDX analiz sonuçları: SEM’de geri saçırma yoluyla elde edilen elektron mikroskop görüntüsü (sol-üst resim), renkli element haritasını (sağ-üst resim), kimyasal elementel analiz grafiği ve element bileşim tablosu (sol-alt resim)

Şekil 4.5.’te CIII (Alg-SC-HA) numunesinin EDX analiz sonuçları verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında CIII numunesinin %53,29 oranı ile en yüksek miktarda oksijen yanı sıra %31,21 C, %11,60 Ca, %3,30 Cl ve %1’in altında eser miktarda sırasıyla P ve Na içerdiği görülmektedir. Elektron mikroskobu görüntüsü incelendiğinde ise CIII numunesi hidroksiapatit varlığından dolayı CI ve CII numunesine göre daha pürüzlü yapıya sahip olduğu görülmektedir. EDX grafiğinde ise Ca ve O piklerinin baskın şiddette olduğu görülmektedir.



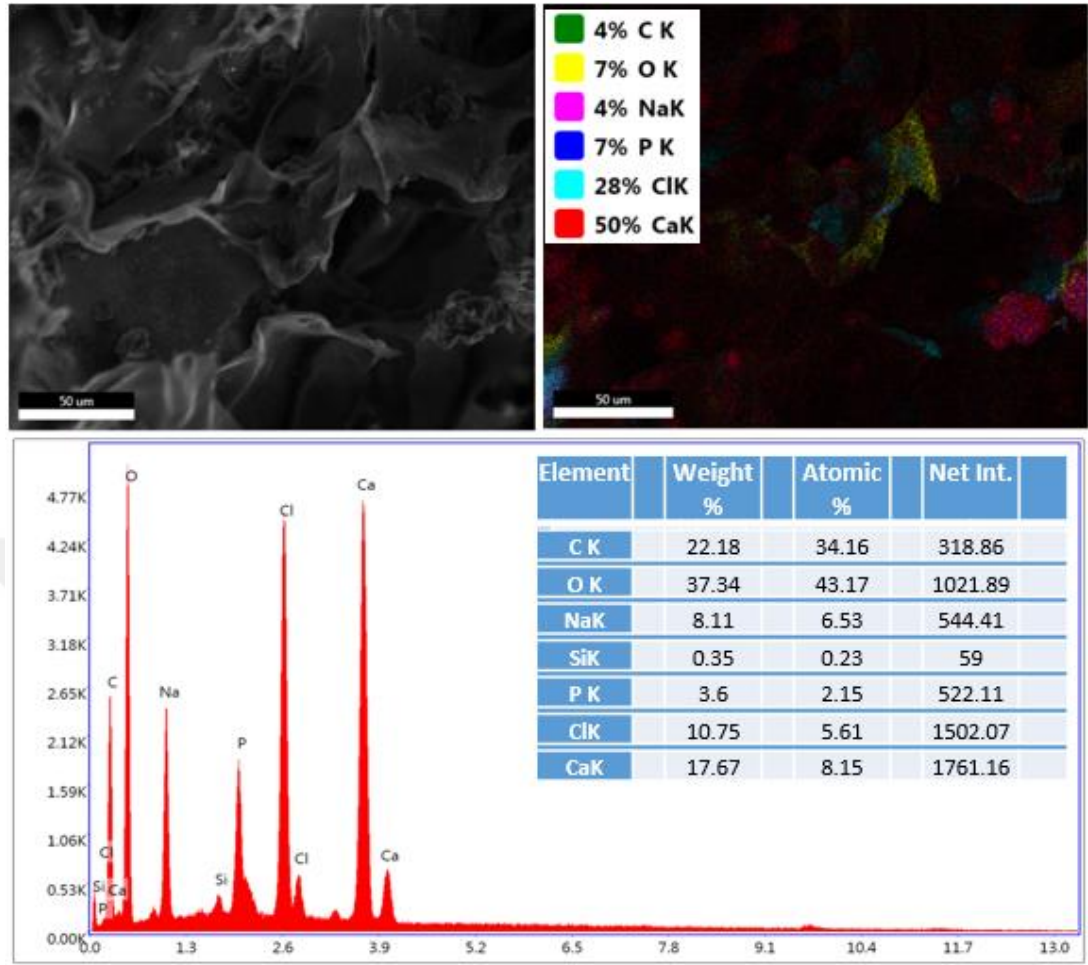
Şekil 4.5. CIII (Alg + HA) skafold numunesine ait EDX analiz sonuçları

Şekil 4.6’da SI (Alg-HA-PM) numunesinin EDX analiz sonuçları verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında hidroksiapatitin varlığından dolayı Ca, O ve P elementlerinin bulunduğu ve en şiddetli piklerin bu elementlere ait olduğu görülmektedir. SI numunesinde pomza katkısından dolayı eser miktarda alüminyum ve silisyum bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda yine pomza katkısından dolayı karbon oranının düştüğü görülmektedir. SEM görüntüsüne bakıldığında ise pomza katkılı HA numunesinin poroz ve birbirine bağlantılı yapılar şeklinde aljinat polimer matrisi üzerinde farklı bölgelerde dağıldığı görülmüştür. Bu nedenle SI numunesinin kemik yenilenmesi ve onarılması prosesindeki, hücrelerin tutunması, göç etmesi ve kan akışı gibi metabolik faaliyetler açısından elverişli bir yapı oluşturduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.6. SI (Alg+HA+PM) numunesinin EDX analiz sonuçları

Şekil 4.7’de SII (Alg-SC-HA-PM-TEC) numunesinin EDX analiz sonuçları verilmiştir. SII numunesinin EDX analiz sonuçları incelendiğinde SI numunesine göre Ca ve O element oranlarının düştüğü ve P, Na ve Si elementlerin seviyelerinin arttığı görülmektedir. Bu durumun SII numunesinde bulunan antibiyotik ilaçtan kaynaklı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.7. SII (Alg+ PM+ HA+ TEC) numunesinin EDX analiz sonuçları

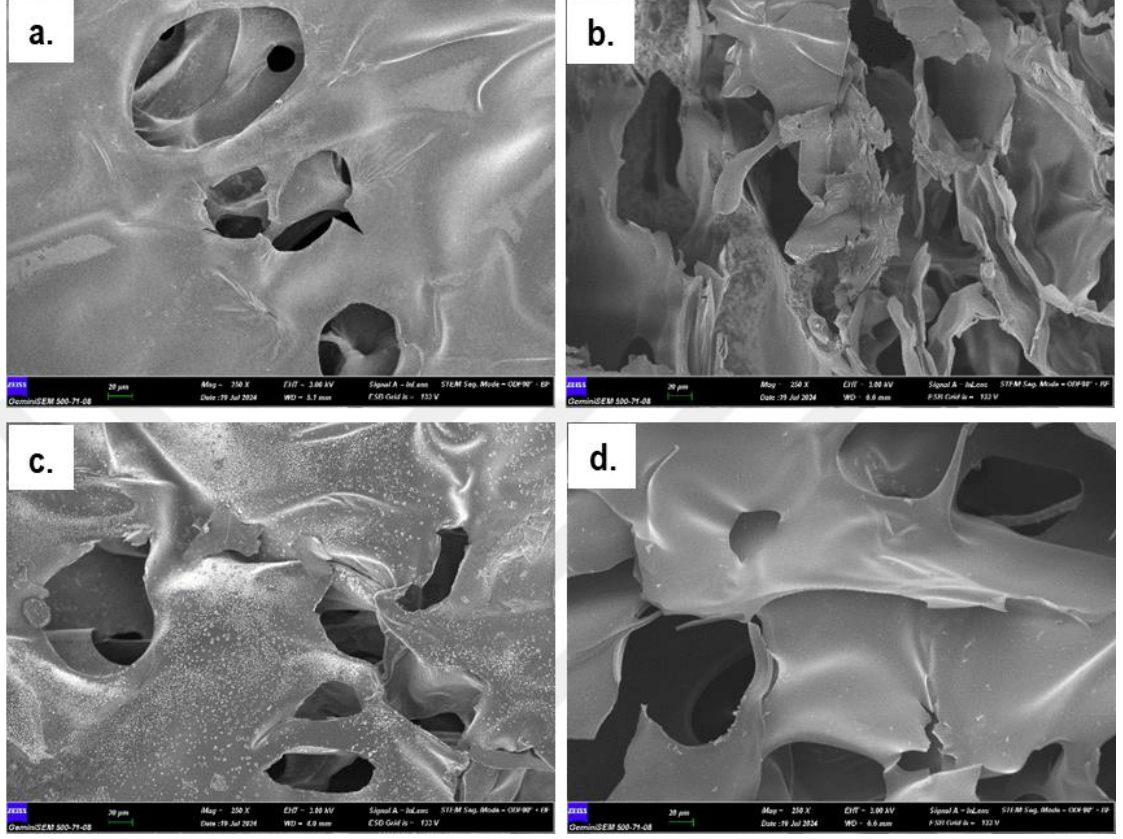
4.2. Morfolojik ve Yapısal Analizler

Hazırlanan numunelerin morfolojik ve yapısal analizleri SEM analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. SEM analizi

Saf aljinat matrisli sodyum sitratız skafold (CI) ve sodyum sitratlı skafold (CII) numunelerinin Şekil 4.8.'de SEM görüntüleri verilmiştir. Her iki numunenin birbirlerine bağlı gözeneklere sahip poroz yapıda oldukları görülmektedir (Samadian vd., 2023). CI ve CII numuneleri arasında büyük bir fark gözlemlenmemiştir. Sodyum sitratın CII numunesinde gözenek boyutunu arttırdığı düşünülmektedir. Kalsiyum klorür ile çapraz bağlı aljinatın bozunma hızı yavaştır bu durumu ortadan kaldırmak ve bozunma hızını arttırmak için sodyum sitratın faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Wu vd., 2016). Bu durumdan dolayı aljinatın bozunma hızını arttırmak ve homojen dağılımını sağlamak amacıyla CII

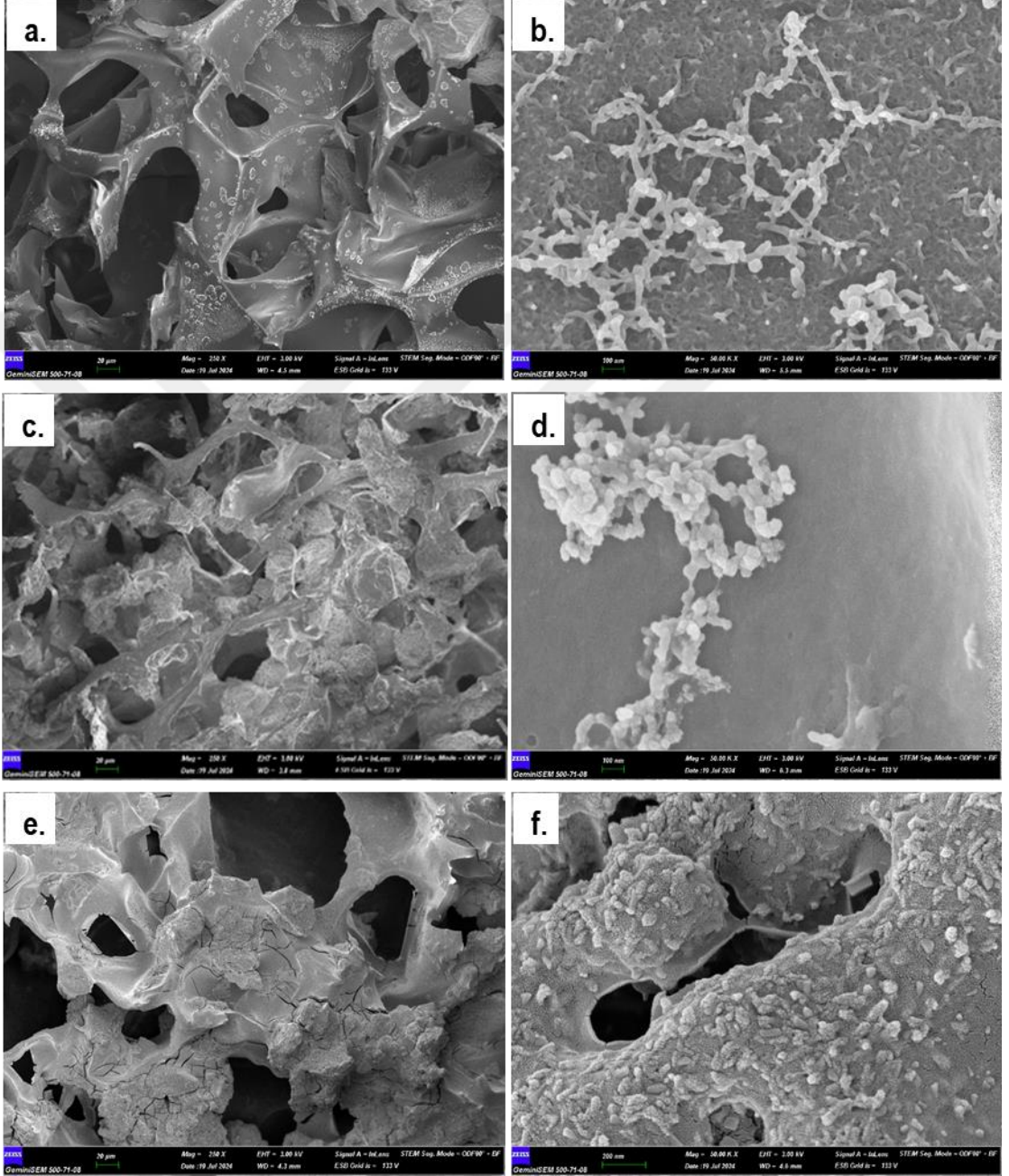
numunesi hazırlanırken sodyum sitrat kullanılmıştır ancak CI ve CII numunelerinin SEM görüntülerinde önemli bir fark görülmemektedir.



Şekil 4.8. Aljinat matrisli skafoldların SEM morfolojik analizleri: (a-b) CI (Alg) ve (c-d) CII (Alg+SC) (Görüntülerdeki ölçek çubukları 20 μ uzunluğundadır)

CIII, SI ve SII numunelerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.9.'da verilmiştir. Şekil 4.9 (a-b)'da verilen saf HA eklenmiş aljinat matrisli skafold numunesinin (CIII) SEM görüntülerine bakıldığında birbirlerine bağlı poroz bir yapıya sahip olduğu ve hidroksiapatit partiküllerinin aljinat yüzeyinde toplanma yaptığı görülmektedir (Parhi vd., 2006). Bu gözenekler hücre büyümesini ve çoğalmasını desteklemek, besin ve kan girişini kolaylaştırmak için önemlidir. Şekil 4.9 (c-d)'da verilen SEM görüntüsüne bakıldığında ise pomza katkılı HA numunesinin (SI) süngere benzer görünüme sahip poroz ve birbirine bağlantılı yapılar şeklinde aljinat polimer matrisi üzerinde farklı bölgelerde dağıldığı görülmüştür. Pomza katkısı yapılarak üretilen SI tane boyutları saf HA eklenmiş CIII numunesine göre azalmış gibi görünmektedir. Yapılan bir çalışmaya göre silikat temelli malzemelerin ilave edildiği biyomalzemelerde tane boyutunu azaltmaya neden olduğu bildirilmektedir (Singh vd., 2021). Şekil 4.9'da (e-f) Teikoplanin yüklenmiş SII numunesinin SEM görüntülerinde ise ilaç yüklemesinden dolayı

gözeneklerin daha büyük ve yoğun olduğu görülmektedir ve ilacın gözenekleri tıkamadığı anlaşılmaktadır. Aynı zamanda yüzeyi kapladığı görülen parçacıklı ve düzensiz şekilde dağılan partiküllerin Teikoplanin olduğu düşünülmektedir.



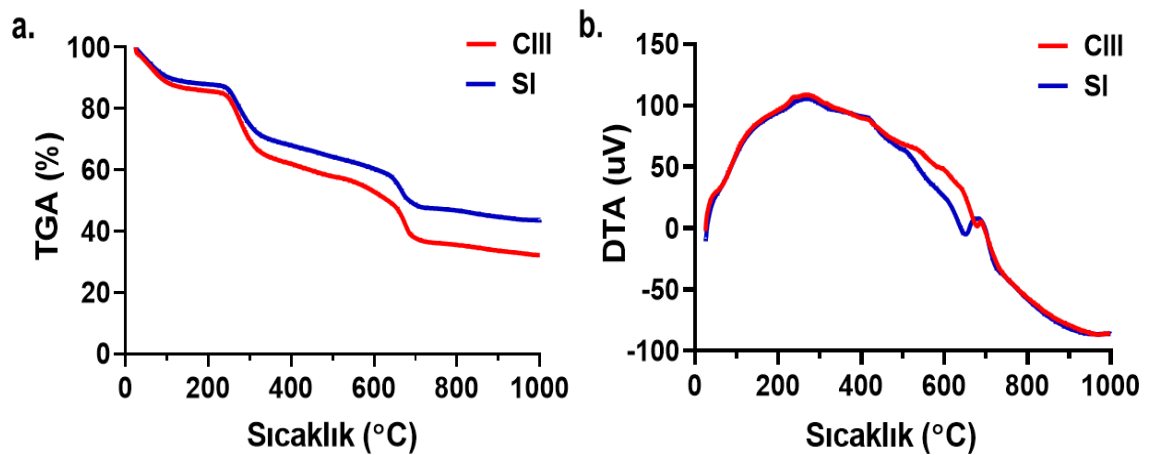
Şekil 4.9. Aljinat matrisli skafoldların SEM morfolojik analizleri: (a-b) CIII (Alg+HA), (c-d) SI (Alg+HA+PM), (e-f). SII (Alg+HA+PM+TEC) (Görüntülerdeki ölçek çubukları (a-c ve e). 20µm, (b-d ve f). 100 nm)

4.3.Termal Analizler

Hazırlanan numunelerin termal analizleri TGA/DTA yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir

4.3.1. TGA/DTA analizleri

CIII ve SI numunelerine ait karşılaştırmalı TGA/DTA eğrileri Şekil 4.10'da verilmiştir. Numunelerin termal analizleri oda sıcaklığı ile 1000 °C arasında gerçekleştirilmiştir. CIII numunesinin TGA eğrisine bakıldığında kademeli bir ağırlık kaybı görülmektedir. 25-250°C aralığında yavaş bir şekilde gerçekleşen ilk ağırlık kaybı %16 civarında ve bu durumunun emilen suyun buharlaşmasından kaynaklandığı ve ikinci ağırlık kaybının 250-300°C aralığında hızlı gerçekleşen ikinci ağırlık kaybının %14 civarında olduğu ve molekül suyunun kaybının yanında aljinatın termal bozunmasından (karbon dioksit, su ve diğer gazlar salarak kütle kaybeder) kaynaklandığı düşünülmektedir (Dong vd., 2011; Son vd., 2012a; Wulandari vd., 2023). Üçüncü kademe ağırlık kaybının 300-650°C aralığında %21 civarında olduğu ve aljinatın ikinci termal bozunmasının gerçekleşerek karbondioksit, su ve diğer gazların salınımından kaynaklanmaktadır (Son vd., 2012a; Wulandari vd., 2023). 650-1000°C aralığında %16 civarında ağırlık kaybı görülmektedir ve hidroksiapatitin yapısındaki hidroksil gruplarının dehidrasyonuna bağlanmıştır (Son vd., 2012a). CIII numunesinin toplam ağırlık kaybı %67 olarak hesaplanmıştır. DTA eğrisine bakıldığında ise 25-650°C aralığında geniş bir endotermik etki görülmektedir.



Şekil 4.10. CIII (Alg+HA) ve SI (Alg+HA+PM) numunelerine ait karşılaştırmalı (a) TGA ve (b) DTA eğrileri

SI numunesinin TGA eğrisine bakıldığında CIII numunesine yakın yakın eğriler ve kademeli ağırlık kaybı görülmektedir. 25-250 °C arasında %14 oranında ilk ağırlık

kaybının absorbe edilen suyun buharlaşmasından ve pomzanın yapısında bulunan safsızlıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Mourhly vd., 2015). 250-640°C arasında %29 oranında ağırlık kaybının aljinatin bozunarak karbondioksit, su ve diğer gazların salınımından ve molekül suyunun buharlaşmasına atfedilmiştir (Swamy vd., 2010; Wulandari vd., 2023). 640-1000°C aralığında organik bileşenler%14 oranındaki ağırlık kaybının hidroksiapatitin yapı suyunun ve aljinatta bulunan karboksil gruplarının uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Dong vd., 2011; Son vd., 2012a). Toplam ağırlık kaybı %57'dir. DTA eğrisi incelendiğinde ise 25-628°C aralığında geniş bir endotermik 628-750°C aralığında küçük bir endotermik tepe görülmektedir. Bu sonuçlara bakıldığında pomza katkısının termal aktiviteyi çok fazla etkilemediği görülmektedir. Pomzanın termal kararlılığının 900°C 'ye kadar korunabildiği ve 1200°C civarında eridiği bildirilmektedir (Mourhly vd., 2015).

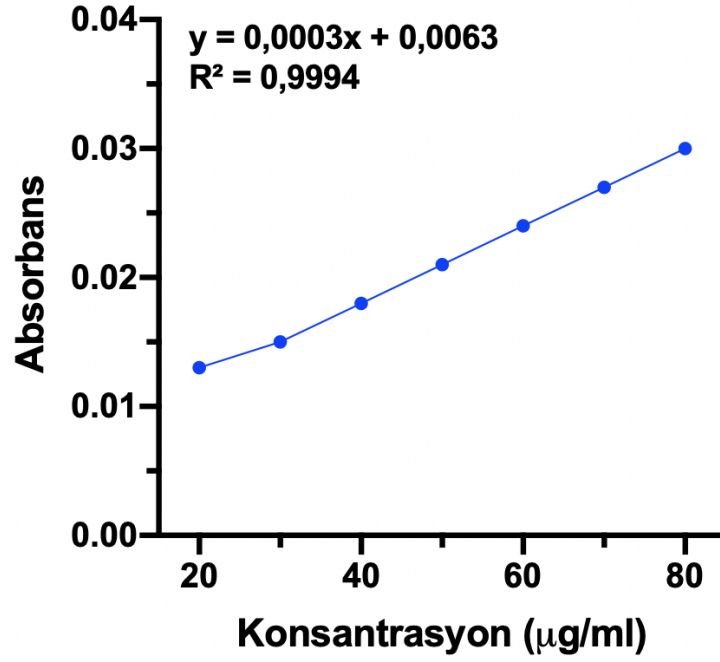
4.4. Biyolojik Analizler

Bu tez çalışmasında biyolojik analizler kapsamında ilaç salınım çalışmaları, şişme, biyoaktivite, antibakteriyellik, biyouyumluluk ve sitotoksosite testleri yapılarak sonuçları incelenmiştir.

4.4.1. Aljinat matrisli kompozit skafoldların ilaç salınım çalışmaları

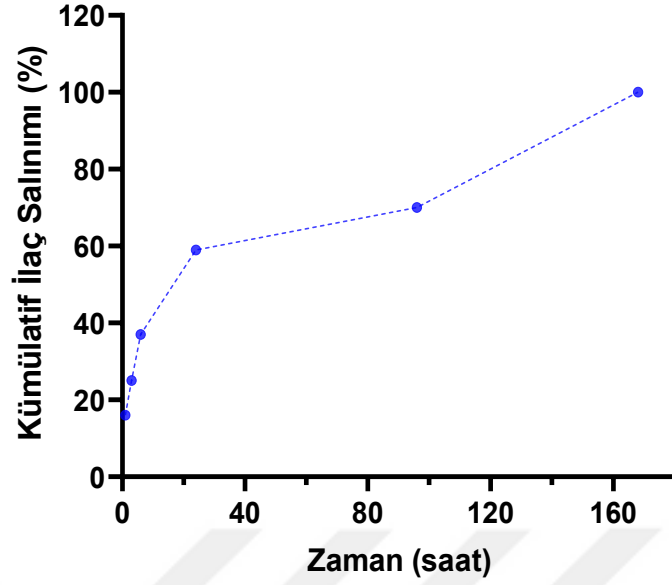
İlaç salınım çalışmaları, 10 mL fosfat tampon çözeltisi (PBS) içeren tüplere ilaç yüklü ve ilaçsız kontrol numuneleri yerleştirildi ve 37 °C'de 7gün boyunca inkübe edildikten sonra salınımı gerçekleştiren Teikoplanin etken maddeli ilacın ölçümleri belirlenen zaman noktalarında (1, 3, 6, 24, 96 ve 168 saat) gerçekleştirilmiştir.

Her ölçüm zamanında 5 mL elüsyon çözeltisi alınmış ve taze PBS ile değiştirilerek inkübasyona devam edilmiştir. Tüplerden alınan elüsyon çözeltisinin UV-Vis Spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülerek ortalama değerler hesaplanmıştır. Aynı zamanda çeşitli konsantrasyonlardaki (20-80 µg/mL) standart ilaç çözeltilerinin UV ölçümleri yapılmıştır. Kademeli olarak artan ilaç konsantrasyonları için tüm absorbans ölçümleri standart doğru olarak elde edilmiştir ve hesaplanan doğrunun denklemi ve R² değeri ile birlikte Şekil.4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. 280 nm dalga boyunda numunelerin absorbans ölçümleri ile elde edilen Teikoplanin etken maddesinin standart eğrisi

Teikoplanin etken maddesi suda çözünebilir bir antibiyotiktir ve PBS ilaç yüklü numunenin yapısına girdiğinde ilacı uygun yerde çözmektedir ve yüksek ilaç konsantrasyonuna sahiptir (Huang vd., 2020). Şekil 4.12’de SII (Alg-HA-PM-TEC) numunesinden Teikoplanin etken maddesinin kümülatif salınım grafiği verilmiştir. Standart eğriden hesaplanan kümülatif ilaç (Teikoplanin) yüzdesi ilk 1 saat sonra %16’iken, 3 saat sonra %25’e, 6 saat sonra %37’ye, 24 saat sonra %59’a ve 96 saat sonra ise %70 ulaştı. 168 saat sonra ilaç salınımı tamamen gerçekleşmiştir. İlaç salınımindaki en büyük artış %70’ten %100’e ulaştığı 96 ile 168 saatleri arasında meydana gelmiştir. Sonuçlara bakıldığında Teikoplanin salınımının kademeli bir şekilde 168 saatte gerçekleştiği söylenebilir. Antibiyotiğin kademeli bir şekilde salınması, numunenin kemik enfeksiyonu tedavisi için potansiyel bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir duruma getirmiştir (Peng vd., 2010).

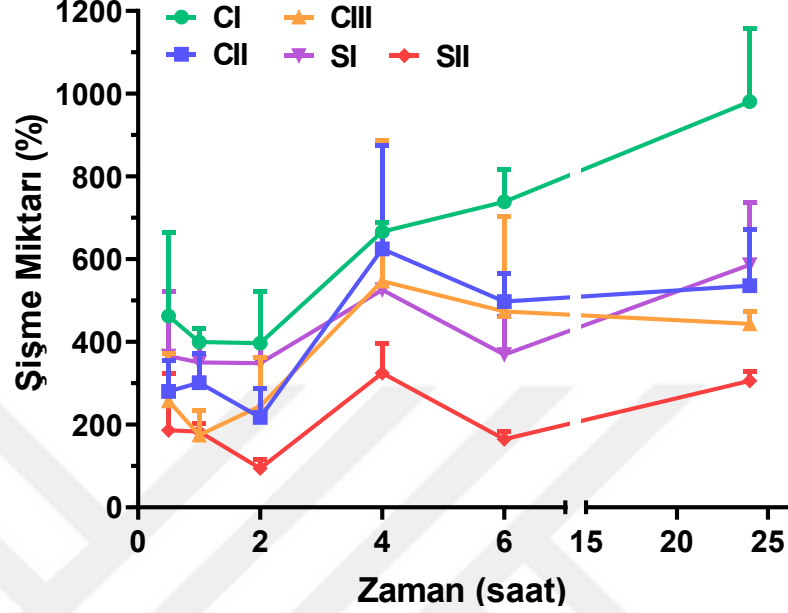


Şekil 4.12. SII (Alg+HA+PM+TEC) numunesinden Teikoplaninin kümülatif salınımı

4.4.2. Şişme (su emme kapasitesi) testi

Farklı hidrojel skafold numunelerin su emme kapasitesi yani şişme potansiyelleri fosfat tampon çözeltisi (PBS) varlığında 3 tekrarlı şekilde test edilerek ölçülmüştür. PBS içerisinde bekletilen numunelerin 30 dk, 1, 2, 4, 6 ve 24 saat zaman aralıklarında kütle değişimleri ölçülmüştür. Şekil 4.13'te hidrojel skafoldların şişme yüzdeleri verilmiştir. Tüm numuneler ilk 30 dakikada suyu emmeye başlayarak şişme göstermiştir. Saf aljinat içeren (sodyum sitratız) CI numunesi deneyin gerçekleştirildiği tüm zaman aralıklarında en yüksek şişme oranlarına sahipken, en düşük şişme oranları ilaç (Targocid) yüklenmiş aljinat matrisli %7,5 Pm katkılı HA (1100°C'de sinterlenmiş) skafold numunesinde (SII) görülmüştür. CI numunesinin yüksek oranda şişmesinin nedeni içeriğinde bulunan aljinatın hidrofilik yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Pawar ve Edgar, 2012). CIII numunesi ile CI numunesi karşılaştırıldığında daha düşük bir şişme oranı görülmektedir. Bu durum aljinatta bulunan polimer zincirlerinin hareket alanları hidroksiapatit partikülleri nedeniyle kısıtlanmasına bağlanabilmektedir (Zhang vd., 2010). Aljinat temelli hidrojellere nano yapı malzemelerin eklenmesinin şişme hızını azalttığı literatürde bildirilmiştir (Zhang vd., 2010). CII numunesi 15 saat sonra şişme denge profiline ulaşılmıştır, ancak diğer numunelerde 24 saat sürecinde tam bir dengeye ulaşmamıştır. En fazla şişme oranı ilk 30 dakika içerisinde gerçekleşmiştir. CI numunesi 24 saat içerisinde kademeli bir artış gösterirken CII, CIII, SI ve SII numuneleri zaman

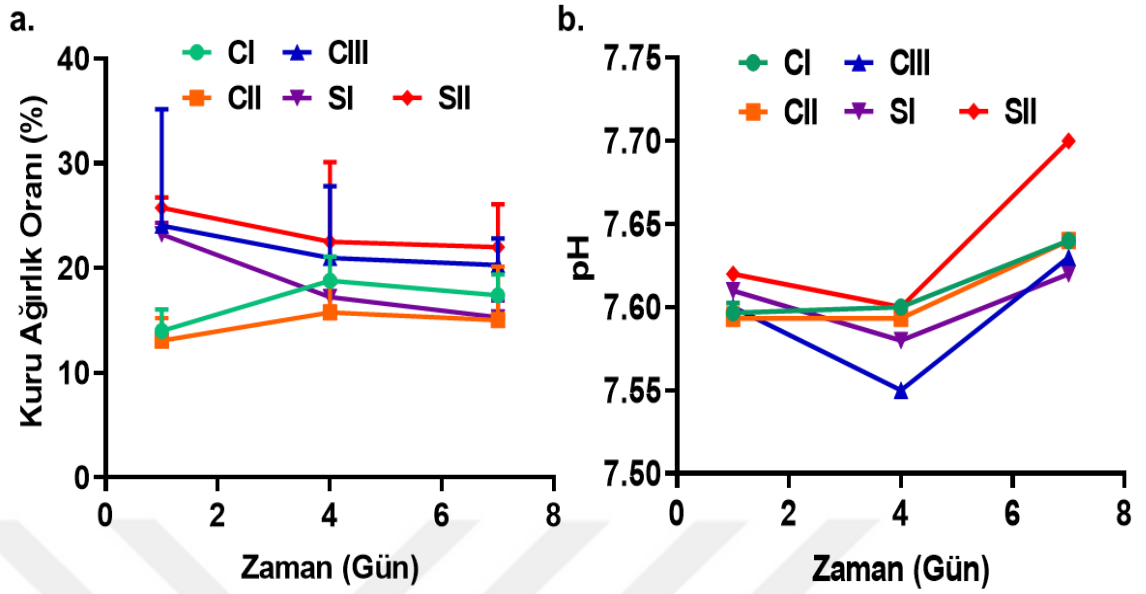
aralıklarında azalma veya artma eğilimleri göstermektedir. 24 saat sonunda numunelerin şişme oranları karşılaştırması sırasıyla CI>SI>CII>CIII>SII'dir.



Şekil 4.13. Hidrojel skafoldların (CI, CII, CIII, SI ve SII) farklı zaman aralıklarında (30 dakika ve 1, 2, 4, 6 ve 24 saat) şişme analizleri

4.4.3. Biyoaktivite testleri

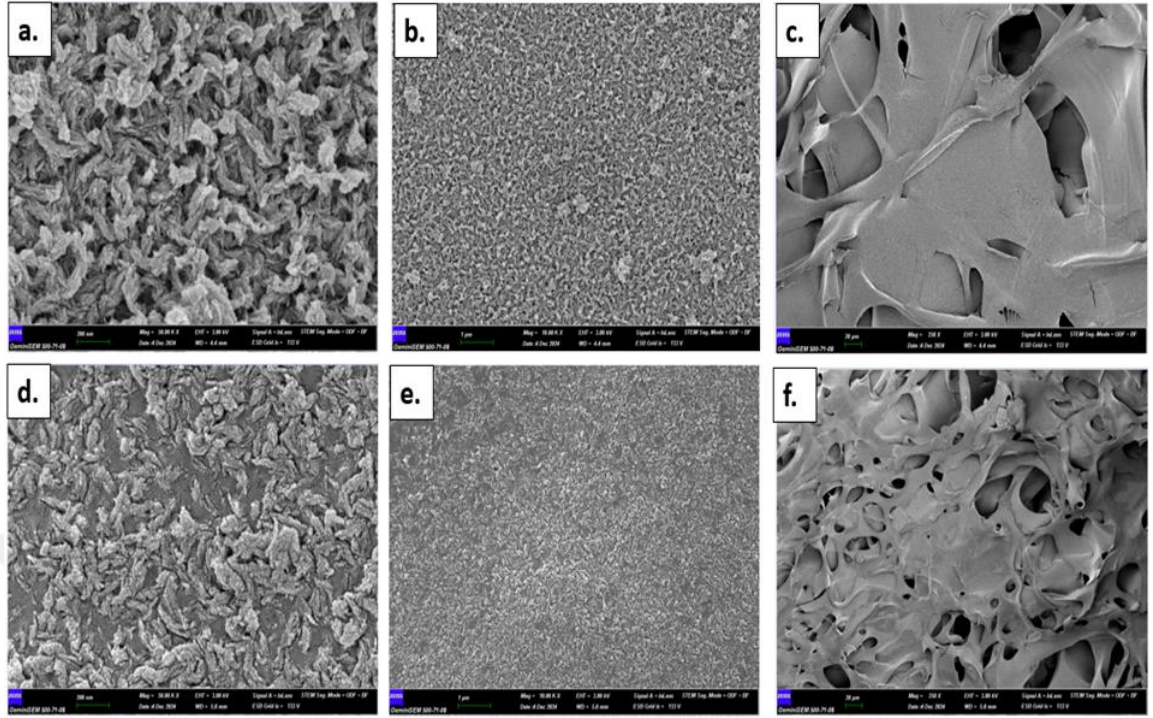
Belirlenen zaman aralıklarında (1, 4 ve 7 gün) SBF ile inkübe edilen numunelerin FT-IR, SEM analizleri ve pH ve ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Numunelerin biyoaktivitesi yüzeylerinde karbonatlı apatit mineral birikimi açısından, 7 güne kadar farklı zaman aralıklarında belirlenen kuru ağırlık oranları yüzdesi olarak çizilmiştir. 1, 4 ve 7 gün aralıklarında ölçülen pH değerleri ve kuru ağırlık yüzdeleri Şekil 4.14'te verilmiştir. Ph analizlerine bakıldığında CI ve CII numunelerinde 1. günden 7. güne kadar pH değerlerinde düzenli bir artış ölçülmüştür. CIII, SI ve SII numunelerinde ise pH değerlerinde 4. günde azalış varken 7. günde artış görülmektedir (Şekil 4.14.(b)) pH değişimlerinde en yüksek pH değeri 7,70 ile SII numunesine aitken, CI numunesi biyoaktivite testinin tüm aralıklarında en yüksek ikinci pH değerine sahiptir. Ortalama pH değişimi SII numunesi için 7,62-7,70 arasında olup diğer numunelerdeki pH değişimine (7,60-7,64) nispeten daha yüksektir. Bu durumun ilaç salınımı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.14. Biyoaktivite test sonuçları, numunelerin (CI, CII, CIII, SI ve SII) SBF ortamında 7 güne kadar farklı zaman dilimlerinde (1, 4 ve 7 gün) inkübe edilmesiyle gerçekleştirilen biyomineralizasyonun araştırılması ile (a) hidrojenlerin kuru ağırlık oranının % 'sinin karşılaştırılması ve (b) biyoaktivite testlerinin farklı zaman aralıklarındaki pH değişimlerinin karşılaştırılması

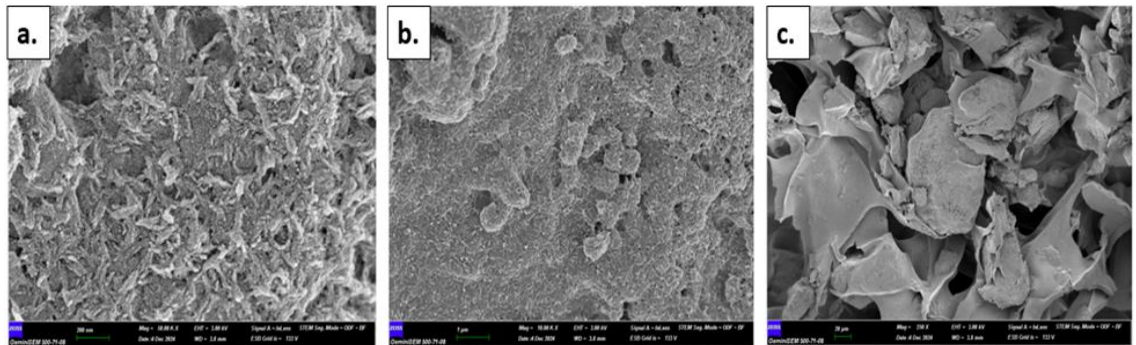
Kuru ağırlık oranları incelendiğinde CI numunesi CII numunesinden %2,4 oranında daha yüksek bir kuru ağırlık yüzdesi göstermiştir ve bu da aljinatın hidrofilik yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. CIII numunesi CII numunesine göre hidroksiapatitin mineralizasyon üzerindeki etkisi ile ilişkili olarak %5,6 oranında daha yüksek kuru ağırlık yüzdesi göstermiştir. SI numunesine bakıldığında pomza ilavesi SI numunesinin kuru ağırlığını düşürmüştür. SI ve SII numunelerinin arasındaki farka bakıldığında ise SII numunesi %6,7 oranında daha yüksek kuru ağırlık oranına sahiptir. SII numunesinin SI numunesinden önemli ölçüde yüksek olmasının sebebi ilaç yüklü numunenin SBF'de *in-vitro* biyomineralizasyona katkıda bulunduğunu gösteriyor; bu apatit oluşumunu teşvik eden SBF'deki iyonları çeken Teikoplanin'nin yapısı ile ilişkilendirilebilir.

SBF ortamında 7 gün inkübe edilen numunelerin mikroyapı görüntüleri SEM analizi yoluyla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir Şekil 4.15'te CI ve CII numunelerinin farklı ölçeklerdeki kesitlerinin SEM görüntüleri verilmiştir. Her iki numunenin 7 günlük inkübasyon sonraki SEM görüntülerinde kristalin mineral oluşumuna ait bir bulgu gözlemlenmemiştir. Farklı ölçeklerdeki kesitler incelendiğinde oldukça yoğun ve küçük mikro gözenekler görülmektedir.



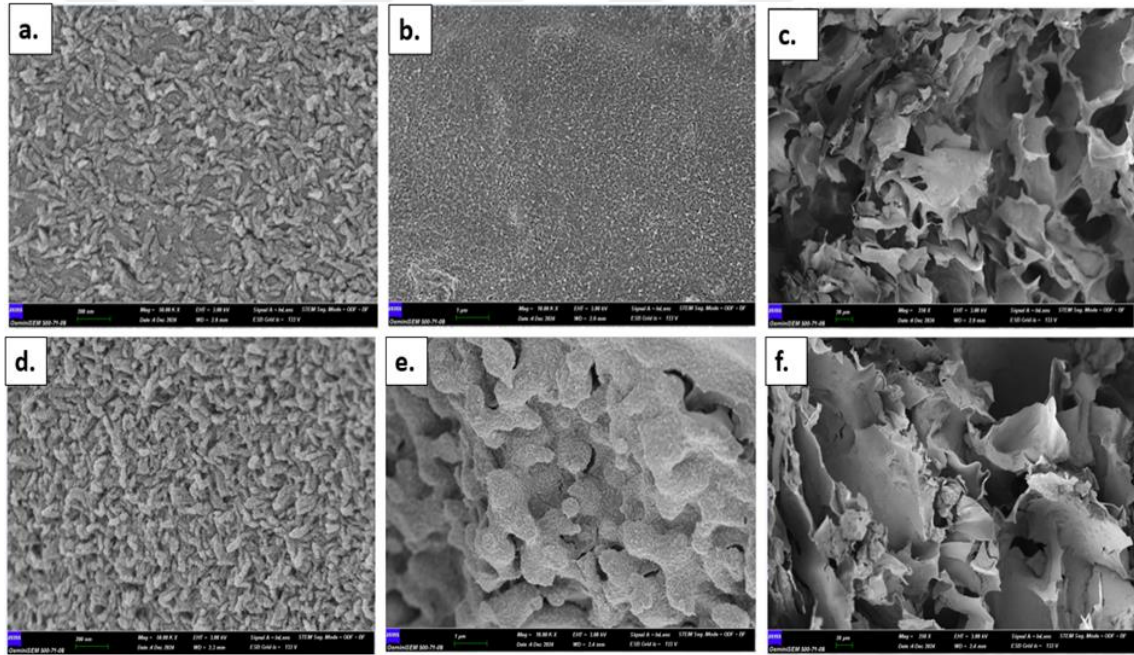
Şekil 4.15.SBF ortamında 7 gün inkübasyondan sonra CI (a-c) ve CII (d-f) numunelerinin farklı ölçeklerdeki kesitlerinin SEM görüntüleri; (Görüntülerdeki ölçek çubukları (a ve d). 200 nm, (b ve e). 1 µm ve (c ve f). 20 µm)

Hidroksiapatit içeren CIII numunesine ait SEM görüntüleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Görüntülere bakıldığında numune yüzeyinin tamamını kaplayan pürüzlü mineralize bir katman görülmektedir. Şekil 4.16.(b)'daki görüntüde görüldüğü gibi hidroksiapatit kristalleri, numunenin tüm yüzeyi boyunca dağılmış, küresel ve yüksek tane boyutuna sahip bir yüzey morfolojisi sergilemiştir. Biyolojik çözeltilerde aljinat, şişme ve çözünme davranışı sergilediğinden dolayı numunenin suyu emmesine ve bozunmanın artmasına neden olarak fosfat iyonlarının çökmesini sağlayabilir (Sayed vd., 2023).



Şekil 4.16. SBF ortamında 7 gün inkübasyondan sonra CIII numunesinin farklı ölçeklerdeki kesitlerinin SEM görüntüleri; (görüntülerdeki ölçek çubukları: a. 200 µm, b. 1 µm ve c. 20 µm)

Şekil 4.17’de SI ve SII numunelerinin farklı ölçeklerdeki SEM görüntüleri verilmiştir. Her iki numunede sünger benzeri gözenekli bir yüzeye sahip oldukları görülmektedir. SI numunesine ait Şekil 4.17 (a-c)’ye bakıldığında saf hidroksiapatit eklenmiş numuneye göre gözeneklerin boyutları artmış gibi görünmektedir. Bu gözenekli yapı biyomedikal uygulamalarda hücrelerin tutunması ve çoğalmasını kolaylaştırmak için oldukça önemlidir. İlaç yüklenmiş SII numunesinin görüntüleri incelendiğinde ise 7 günlük inkübasyondan sonra hidroksiapatit kristallerinin küresel şekle sahip olduğu ve numunenin yüzeyini kapladığı gözlemlenmiştir. Pomzanın yapısında bulunan silisyumun hidroksiapatit oluşmasına ve çökmesine neden olabilmektedir. Sonuçlar, 7 günlük SBF inkübasyonundan sonra birbirine bağlı gözenekli ve yoğun apatit tabakasının çökmesinin oluştuğunu gösterdi (Subuki vd., 2020; Yücel vd., 2012) .



Şekil 4.17.SBF ortamında 7 gün inkübasyondan sonra SI (a-c) ve SII (d-f) numunelerinin farklı ölçeklerdeki kesitlerinin SEM görüntüleri; (Görüntülerdeki ölçek çubukları (a ve d). 200 nm, (b ve e). 1 µm ve (c ve f). 20 µm)

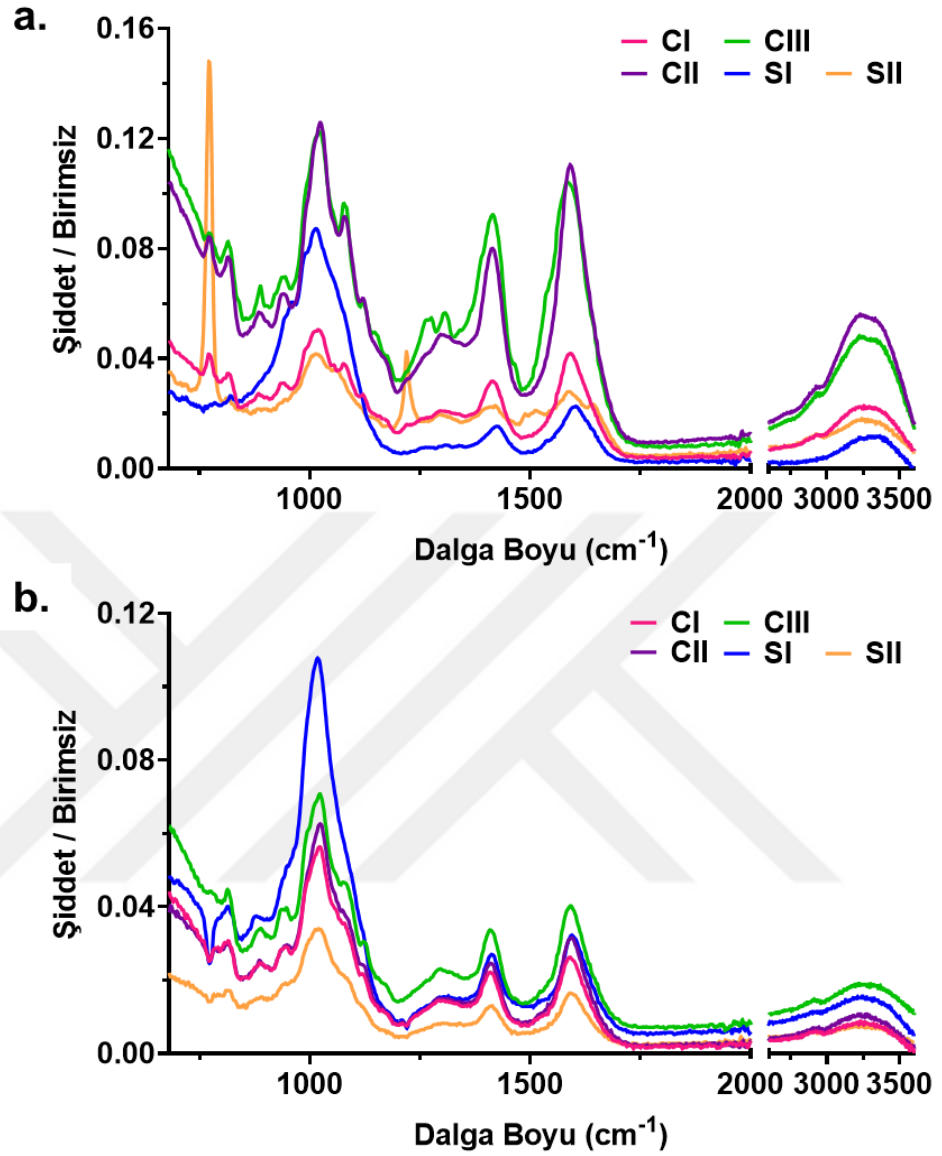
SBF’ye daldırılmadan önce ve SBF içinde 7 gün inkübe edilip kurutulan numunelerin karşılaştırmalı FT-IR analizleri Şekil 4.18’de verilmiştir. CIII, SI, SII numuneleri SBF’de inkübe edildikten sonra fosfat gruplarının şiddetlerinde artma olduğu gözlemlenmiştir. Hidroksiapatit içermeyen CI ve CII numunelerinin SBF’de 7 gün inkübe edildikten sonraki FT-IR spektrumlarının birbirine benzer olduğu görülmektedir. Numunelerin her

ikisinde birden 3000-3500 cm^{-1} 'de görülen geniş pik aljinatın hidroksil gruplarının O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Manjula vd., 2013). 1591 cm^{-1} ve 1414 cm^{-1} 'de bulunan pikler aljinatın karboksil grubunun C=O gerilmesine bağlanmıştır (Zhang vd., 2022). 1019 cm^{-1} 'de bulunan pik polisakkaritin C-H gerilme titreşimine bağlanırken 2926 cm^{-1} 'deki düşük şiddetli pik C-O-C gerilme titreşimine atfedilmiştir (Samadian vd., 2023). Ayrıca CI ve CII numunelerin pik şiddetlerinde azalma gerçekleşmiştir, bu durum zaman içinde numunelerin bozunduğunu göstermektedir.

CIII numunesinin FT-IR spektrumu incelendiğinde SBF inkübasyonu sonunda tepe yoğunluklarında azalma olmuştur. 3000-3500 cm^{-1} dalga boyunda bulunan geniş pik ve 629 cm^{-1} 'deki pik hidroksil grubunun O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1595 ve 1412 cm^{-1} dalga boylarında bulunan pikler ise aljinatın karakteristik asimetric ve simetric karboksil grubunun C=O gerilme titreşimine atfedilmiştir. 1086 cm^{-1} ve yanında bulunan 1018, 957 cm^{-1} 'deki pikler asimetric ve simetric PO_4^{3-} grubuna atfedilmiştir (Aslanov vd., 2017; Rehm ve Bonfield, 1997; Sayed vd., 2023; Shahid vd., 2023; Son vd., 2012b).

%7,5 pomza katkılı SI numunesine ait spektruma bakıldığında diğer numunelerdeki gibi 3000-3500 cm^{-1} 'de bulunan geniş pik hidroksil grubunun O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1602 ve 1423 cm^{-1} 'de görülen pikler ise aljinatın karakteristik karboksil grubunun C=O gerilmesine atfedilmiştir. 1014 cm^{-1} 'de görülen en şiddetli pik ve 960 cm^{-1} 'deki küçük tepe hidroksiapatitin fosfat (PO_4^{3-}) grubu neden olmaktadır. 819 ve 779 cm^{-1} 'de görülen küçük tepeler ise pomzanın Si-O bağlarının eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Bang vd., 2015; Komur vd., 2016; Latifi vd., 2017; Rehm ve Bonfield, 1997).

İlaç yüklenmiş SII numunesinin spektrumu ile ilgili olarak 3000-3500 cm^{-1} arasındaki geniş tepe noktası diğer numunelerde olduğu gibi hidroksil grubunun O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1595 cm^{-1} ve 1419 cm^{-1} 'de görülen pikler C=O gerilme titreşimlerine atfedilmiştir. 1018 cm^{-1} 'de bulunan pik ise hidroksiapatitin fosfat grubuna atfedilmiştir. (Amiri vd., 2020; Komur vd., 2016; Shahid vd., 2023).



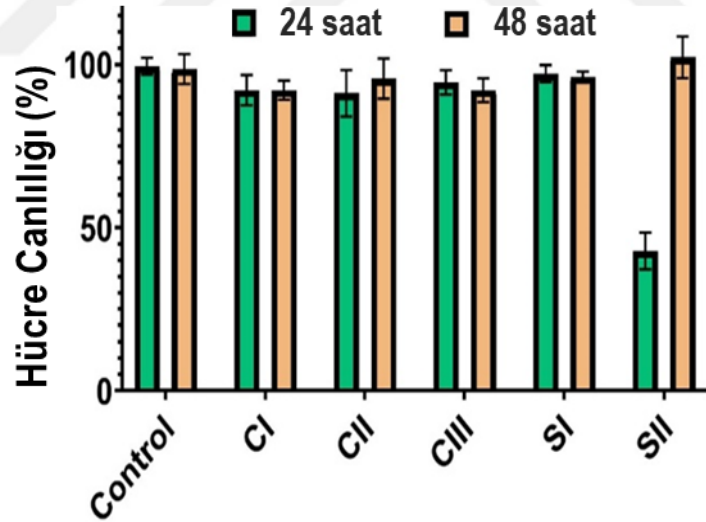
Şekil 4.18. Biyoaktivite testi yapılan CI, CII, CIII, SI ve SII numunelerinin karşılaştırmalı ATR spektroskopisi (a) SBF'de inkübasyondan önce (0. Gün) ve (b) SBF'de 7 günlük inkübasyondan sonra

4.4.4. Biyouyumluluk ve sitotoksosite testleri

Biyouyumluluk çalışması kapsamında biyomalzemeler ekstraktlarının sitotoksitesisi, hücre canlılığı, hücre çoğalması gibi çeşitli hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar incelenmiştir.

4.4.4.1. Ekstraktların sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi

Şekil 4.19’da aljinat bazlı biyomalzemelerden elde edilen sıvı özütlerle muameleden sonra normal insan fetal osteoblastının (hFOB 1.19 hücre hattı) canlılığı sonuçları verilmiştir. Gerçekleştirilen MTT testi sonucuna göre, 24 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen biyomalzeme özütleri arasında SII biyomalzemesi, kontrol hücreleri ile (%100) karşılaştırıldığında hücre canlılığını yaklaşık %50 oranında azalttığı görülmektedir. CI, CII, CIII ve SI numuneleri ise kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılığının %100’e yakın olduğu ve azalma olmadığı görülmüştür. Daha sonra ikinci 24 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen tüm numuneler, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında azalma olmadığı gözlemlenmiştir. Bu yüzden elde edilen sonuçlar CI, CII, CIII ve SI biyomalzemelerinin toksik olmadıklarını göstermektedir. Bunun yanında, SII biyomalzemesi incelendiğinde, inkübasyonun ilk 24 saati süresince sitotoksik etkiye neden olan antibiyotikleri serbest bıraktığı görülmektedir. Bu sürenin sonunda ise, antibiyotik salınım sürecinin durduğu düşünülmektedir ve hücre canlılığında herhangi bir azalma gözlenmemiştir.

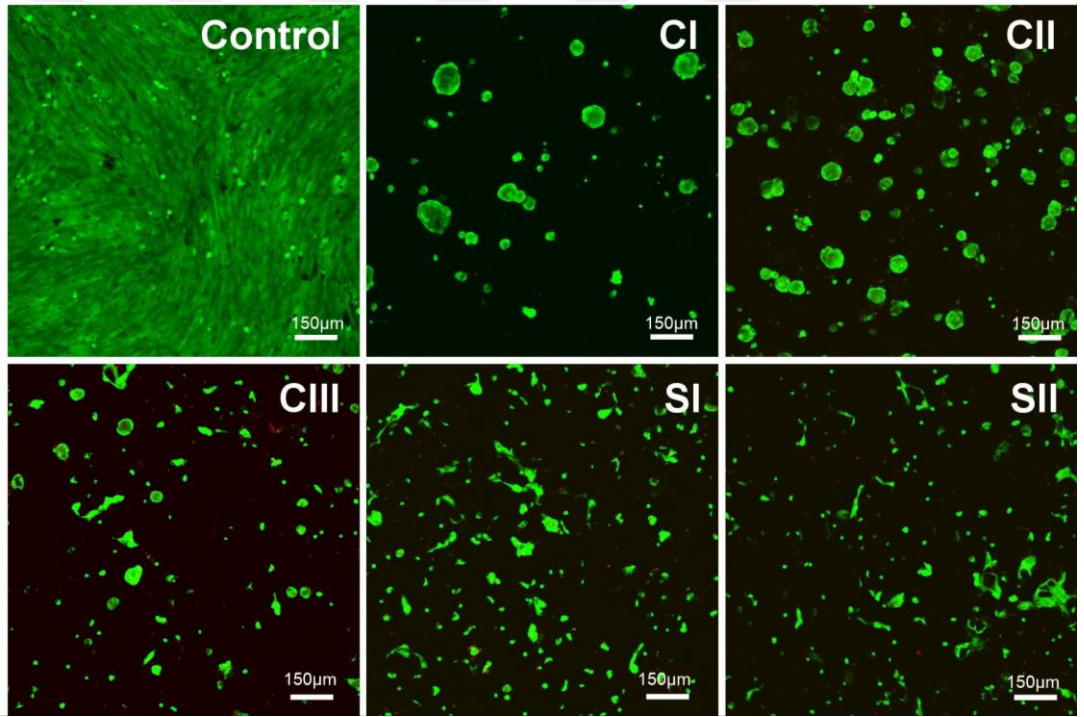


Şekil 4.19. Aljinat bazlı biyomalzemelerden elde edilen sıvı özütlerle muameleden sonra normal insan fetal osteoblastının (hFOB 1.19 hücre hattı) canlılığı

4.4.4.2. Biyomalzemeler üzerinde büyüyen hücrelerin canlılığı testi

Şekil 4.20’de aljinat bazlı iskelelerde yetiştirilen normal insan fetal osteoblastının (hFOB 1.19 hücre hattı) canlılığı sonuçları verilmiştir. 48 saatlik inkübasyon gerçekleştirildikten sonra, konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) altında gözlemlenen aljinat bazlı biyomalzemeler üzerinde kültüre edilen hFOB 1.19 hücrelerinin yeşil floresans yaydığı

ve çoğunlukla canlı olduğu görülmektedir. Saf aljinat içeren CI ve CII biyomalzemelerinde ise canlı hücrelerinde bulunduğu fakat çoğunlukla yuvarlak olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum hücrelerin biyomalzemenin yüzeyine zayıf yapışmasına neden olduğunu gösterebilir. Ayrıca hidroksiapatit veya hidroksiapatit ve pomza ile zenginleştirilmiş biyomalzemelere yani CIII, SI ve SII bakıldığında, canlı hücrelerin bulunduğu tespit edilmiştir ancak sadece yuvarlak hücreler değil yassı olanlar da gözlemlenebilmektedir. Bu durum biyomalzemenin yüzeyine hücrelerin biraz daha iyi yapışmalarına neden olduğunu gösterebilir. Literatürde gerçekleştirilen aljinat ile ilgili çalışmalarda aljinatın zayıf hücresel yapışmaya ve farklılaşmaya neden olduğu belirtilmiştir (Wu vd., 2016). Buna göre bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatürle örtüşmektedir.

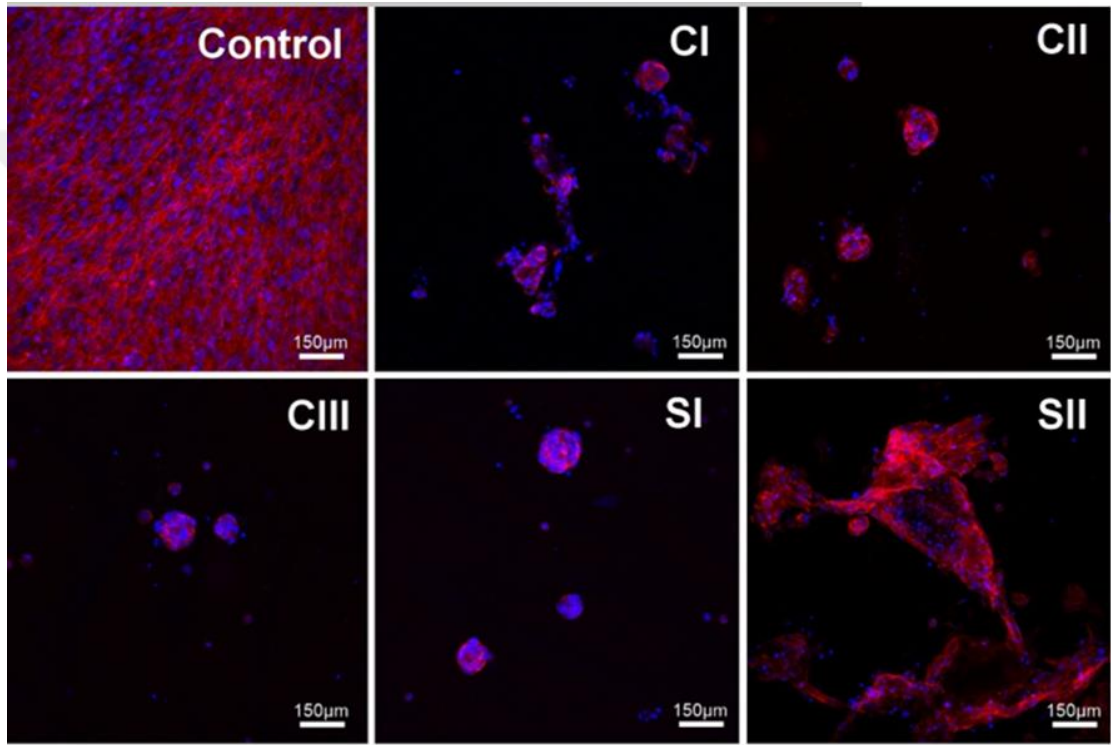


Şekil 4.20. Aljinat bazlı skafoldlar üzerine yapışan normal insan fetal osteoblast hücrelerinin (hFOB 1.19 hücre hattı) canlılığı CLSM görüntüleri. (Polistiren üzerinde ekilen hücreler kontrol olarak kullanıldı. Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızı floresans yayar. Ölçek çubukları 150 μm 'dir)

4.4.4.3. Biyomalzemeler üzerinde büyüyen hücrelerin çoğalma testi

Şekil 4.21'de aljinat bazlı skafoldlarda büyüyen normal insan fetal osteoblastının (hFOB 1.19 hücre hattı) proliferasyonuna ait konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 4.21'de

verilmiştir. CI, CII, CIII ve SI biyomalzemelerinde büyüyen hücrelerin kümeler halinde büyüdüğünü ve zayıf bir sitoskeletonları olduğunu ortaya koymuştur. SII biyomalzemesi üzerinde büyüyen hücreler uzamış, iyi yassılaştırmış ve iyi gelişmiş bir sitoskeletal sisteme sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, daha uzun inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar biraz şaşırtıcıdır, çünkü hidroksiapatit eklendikten sonra biyomalzemelerin sityouyumluluğunda herhangi bir artış kaydedilmemiştir. Bu durum yalnızca SII durumunda gözlemlendiğinden dolayı daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

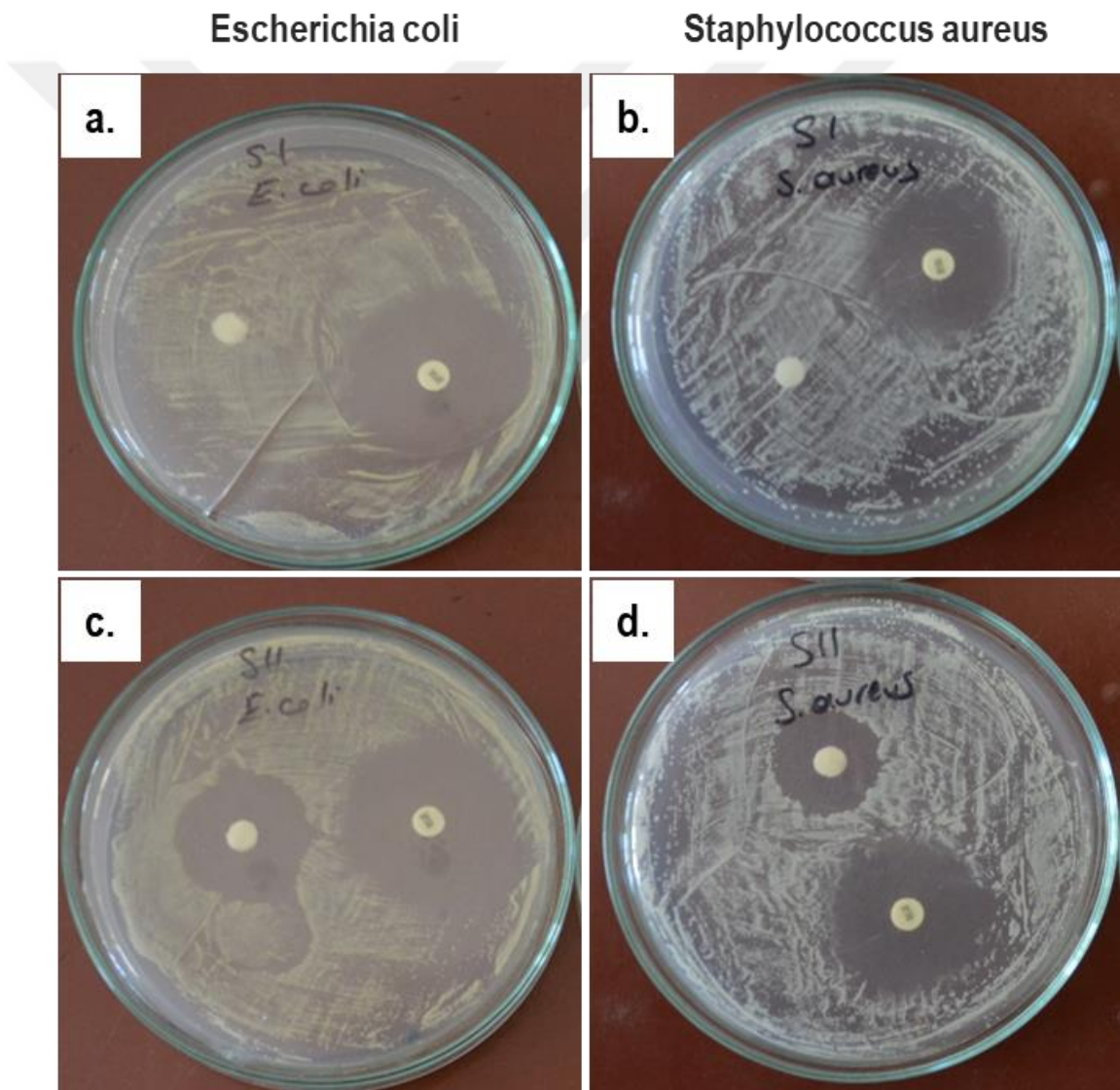


Şekil 4.21. Aljinat bazlı iskelelerde büyüyen normal insan fetal osteoblastının (hFOB 1.19 hücre hattı) proliferasyonunun kalitatif değerlendirmesi. Polistiren üzerinde kültürlenmiş hücreler kontrol hücreleri olarak kullanıldı. Hücreler 7 günlük inkübasyondan sonra Hoechst 33342 ve Alexa-Fluor Phalloidin 635 boya ile boyandı ve 200x büyütmede bir CLSM altında gözlemlendi. Hücre çekirdekleri mavi floresans yaydı, sitoskeleton ise kırmızı floresans yaydı. Çubuk ölçeği = 150 µm

4.4.5. Antibakteriyel analizler

Antibakteriyel analizler *E. coli* ve gram-pozitif *S. aureus* bakterileri kullanılarak 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. SI (Alg-HA-PM) ve SII (Alg-HA-PM-TEC) numuneleri disk şeklinde hazırlanarak karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Besiyeri ve bakteri ekili petri kapları içerisine yerleştirilen numunelerin karşısında antibakteriyel bir ilaç olan

Tetramycine kontrol numunesi olarak kullanılmıştır Şekil 4.22’de *E.coli* (ATCC 25922) ve *S.aureus* (ATCC 25923) bakterileri ile test edilen numunelerin bakteri inhibisyon zonlarını gösteren antibakteriyel test sonuçları verilmiştir. Şekil 4.23.(a)’da SI numunesinin antibakteriyel testlerinde bakteri türlerine karşı herhangi bir önleme zonu oluşumu gözlenmemiştir. Fakat şekil 4.22.8b)’de verilen Teikoplanin etken maddeli ilaç yüklü SII numunesinin antibakteriyel test sonucunda numunenin etrafında yer alan belirgin şeffaf görünümlü bakteri inhibisyon zonlarının oluştuğu yani antibakteriyel etkinlik gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.22. *E.coli* (ATCC 25922) ve *S.aureus* (ATCC 25923) bakterileri ile test edilen (a) SI ve (b) SII numunelerinin inhibisyon zonlarını gösteren antibakteriyel test sonuçları

Numunelerin bakterilerle inkübasyonu sırasında oluşan bakteri önleyici inhibisyon zon çapları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Antibakteriyel test sonucu inhibisyon zon çapları

Test Mikroorganizması	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
Numune Adı		
SI	-	-
SII	21 ± 0.82	29 ± 0.82
Pozitif Kontrol Tetramycine-(30 mg)	30	40

Tabloya göre SI numunesi iki bakteri türüne karşı inhibisyon zonu oluşturmamıştır kısacası SI numunesi antibakteriyel etkinlik göstermemiştir. SII numunesi ise her iki bakteri türüne karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur fakat ilaç kontrolünün inhibisyon zon çapından daha az antibakteriyel özellik sergilediği görülmektedir. SII numunesinin sırasıyla *E. Coli* ve *S. Aureus* bakterilerine karşı etkinliğinin daha fazla olduğu görülmüştür.

5. BÖLÜM

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında ekstraselüler matrisine benzer biyomimetik yapısı, suda çözünebilir olması ve jel oluşturabilme yeteneği nedeniyle doğal bir polisakkarit olan aljinat matris ile doğal pomza minerali katkılı hidroksiapatit nanopartikülleri birleştirilerek oluşturulan Alg-PM-HA kompozit skafoldlar geliştirilmiştir. Literatürde kompozit skafoldların, Doku Mühendisliği alanında kemik dokusunun onarımı ve yenilenmesi uygulamaları için potansiyel bir seçenek olduğu ile ilgi çalışmalar mevcuttur. Fakat bildiğimiz kadarıyla kemik onarımı ve rejenerasyon uygulamaları için aljinat matrisli pomza katkılı hidroksiapatit skafoldlar ilk kez araştırılmıştır.

Pomza katkılı hidroksiapatit tozları, sol-jel metodu ile biyomimetik hidroksiapatitin üretimi sırasında doğal pomza (%7,5) ilave edilerek üretilmiş ve 1100°C'de sinterlenmiştir. Üretilen saf ve pomza katkılı hidroksiapatit tozları *freeze-gelation* metodu ile aljinat polimer matrisi içerisine karıştırma yoluyla birleştirilerek CaCl₂ çözeltisi ile çapraz bağlanmış kompozit skafoldlar geliştirilmiştir. Üretilen PM katkılı HA numuneler üzerine Teikoplanin antibiyotik entegresi ile kontrollü ilaç salınımı yapabilen kompozit skafoldlar kemik onarımı ve yenilenmesi için araştırılmıştır. Geliştirilen kompozit skafoldlar; morfolojik, kimyasal, termal ve biyolojik analizler yoluyla karakterize edilmiştir.

SEM ile gerçekleştirilen morfolojik karakterizasyon sonuçları incelendiğinde genel olarak numunelerin poroz bir yapıda oldukları görülür. Saf HA eklenmiş Alg matrisli skafold numunesi (CIII), birbirlerine bağlı poroz bir yapıya sahip olduğu ve hidroksiapatit partiküllerinin aljinat matrisinin yüzeyinde belli bölgelerde dağıldığı görülmüştür. SI ve SII numunelerinde biyoseramik partiküllerin birbiriyle bağlantılı ağ şeklindeki yapılarda Alg polimer matrisi üzerinde farklı bölgelerde dağıldığı görülür.

Kimyasal analizler kapsamında XRD analiz sonuçlarında HA kristalin bir yapıda olmasına rağmen CIII, SI ve SII numuneleri pomza ve aljinattan kaynaklı amorf bir yapıya sahip oldukları ve 1100°C'de sinterlendikleri için β -TCP fazının oluştuğu görülmüştür. EDX analizlerinde ise CIII numunesi %53,29 oranı ile en yüksek miktarda oksijen elementi içerdiğini %31,21 C, %11,60 Ca, %3,30 Cl ve %1'in altında eser miktarda sırasıyla P ve Na içerdiği görülmektedir. SI numunesinin sonuçlarına

bakıldığında hidroksiapatitin varlığından dolayı Ca, O ve P elementlerinin bulunduğu ve en şiddetli piklerin bu elementlerde olduğu görülmektedir. SI numunesinde pomza katkısından dolayı silisyum ve eser miktarda alüminyum bulunduğu tespit edilmiştir. SII numunesinin EDX analiz sonuçları incelendiğinde ise SI numunesine göre Ca ve O element oranlarının düştüğü ve P, Na ve Si elementlerin seviyelerinin arttığı görülmektedir. Bu durumun SII numunesinde bulunan Teikoplanin varlığından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Biyolojik analizler kapsamında gerçekleştirilen ilaç salınım çalışmalarında ilaç entegre edilmiş aljinat matrisli %7,5 pomza katkılı hidroksiapatit kompozit skafold (SII) numunesinden antibakteriyel ajan olan Teikoplanin etken maddesinin salınımı ilk 1 saatten sonra %16'ıken, 3 saat sonra %25'e, 6 saat sonra %37'ye, 24 saat sonra %59'a ve 96 saat sonra ise %70 olurken 168 saat somununda tamamen gerçekleşmiştir. Bu durumda Teikoplanin salınımının hızlı bir şekilde ve doğrusal bir salınımda gerçekleşmesi SII numunesinin kemik enfeksiyonu tedavisinde kullanabilmek amacıyla umut verici bir ilaç taşıyıcı sistem olduğunu göstermektedir. Kompozit skafold numuneleri PBS varlığında şişme testi gerçekleştirildiğinde ilk 30 dk içerisinde suyu emmeye başlayarak yüksek bir şişme oranı gösterdiler. CI numunesi en yüksek şişme oranı gösterirken, en düşük şişme oranı ise SII numunesinde görülmüştür. CI numunesinin yüksek oranda şişmesinin nedeni içeriğinde bulunan suda çözünebilir ve hidrofilik yapıya sahip aljinat ile ilişkilendirilebilir. Saf aljinat içeren CI numunesine göre hidroksiapatit eklenerek elde edilen CIII numunesinde şişme oranı azalmıştır. Bu durum aljinatta bulunan polimer zincirlerinin hareket alanları hidroksiapatit partikülleri nedeniyle kısıtlanmasına bağlanabilmektedir. Çalışmamızdaki skafoldların yüksek şişme oranına sahip olması, su absorplama kapasitesi yüksek olan aljinat ve pomzadan kaynaklanmaktadır. SBF oranında yapılan biyoaktivite çalışmaları, çeşitli karakterizasyonlarla (FT-IR ve SEM) desteklenmiştir. Numunelerin kuru ağırlık oranlarına bakıldığında CI numunesi CII numunesinden daha yüksek bir kuru ağırlık yüzdesi göstermesinin sodyum sitratın mineralizasyon üzerindeki etkisiyle ilişkilendirilebilir. CIII numunesi ise CI ve CII numunesinden daha yüksek kuru ağırlık yüzdesi göstermesi, hidroksiapatit ilavesinin mineralizasyon üzerindeki etkisinden kaynaklanabilmektedir. SI numunesi incelendiğinde ise pomza ilavesi kuru ağırlık oranını düşürdüğü görülmektedir bu durumda pomzanın mineralizasyon üzerindeki etkisi ile ilgilidir. SI ve SII numuneleri

karşılaştırıldığında ise ilaç entegre edilmiş SII numunesinin daha yüksek kuru ağırlık oranına sahiptir. SII numunesinin SI numunesinden önemli ölçüde yüksek olması ilaç yüklü numunenin SBF'de apatit oluşumunu teşvik ederek *in-vitro* biyomineralizasyona katkıda bulunduğunu göstermiştir. Kompozit skafoldların yüzeyinde küresel şekle sahip hidroksiapatit tabakasının birikimi SEM görüntüleri ile doğrulanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kompozit skafoldlar, hücrelerde herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Saf aljinat içeren CI ve CII numunelerde canlı hücrelerinde bulunduğu fakat çoğunlukla yuvarlak olduğu bu nedenle numunelerin yüzeyine hücrelerin zayıf yapışma sağladıkları söylenebilir. Ayrıca hidroksiapatit veya hidroksiapatit ve pomza ile zenginleştirilmiş CIII, SI ve SII bakıldığında, bu numunelerin yüzeyine hücrelerin biraz daha iyi yapışma göstermişlerdir. Aljinatın hücre canlılığı ve çoğalmasındaki olumsuz etkisi farklı çalışmalarda rapor edilmiştir.

S. aureus ve *E. coli* bakteri türlerine karşı, SI ve SII numunelerine antibakteriyel test yapılmıştır. Sonuçlara göre, SI numunesi iki bakteri türüne karşı antibakteriyel etkinlik göstermemişken ilaç entegre edilmiş SII numunesi ise her iki bakteri türüne karşı antibakteriyel etkinlik sergilemiştir. Bu sonuçlar ilaç entegre edilmiş aljinat matrisli %7,5 PM katkılı HA kompozit skafoldların iyi bir antibakteriyel özellikler sergilediğini göstermiştir.

Tüm sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde geliştirilen kompozit skafoldları, yüksek biyoaktivite, uygun morfolojik yapı düşük sitotoksosite ve antibakteriyel etkinlikleri nedeniyle kemik hasarlarının onarımında ve enfeksiyon kontrolünde yararlı bir biyomalzeme seçeneği olduğunu düşünülmektedir. Bu yapıların aynı zamanda hücresel aktiviteyi ve doku yenilenmesini teşvik eden, ihtiyaç halinde ilaç salınımı gerçekleştirerek tedavi sürecine katkıda bulunabilecek potansiyeli olan skafoldlar oldukları öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Acet Ö (2021) Investigation Of BSA Adsorption Performances of Metal Ion Attached Mineral Particles Embedded Cryogel Discs. *Manas Journal of Engineering* 9:65-71.

Ahmed EM (2015) Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review. *Journal of Advanced Research* 6:105-121.

Cardoso AD, Van Den Beucken JJJP, Both LLH, Bender J, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG (2014) Gelation and Biocompatibility of Injectable Alginate-Calcium Phosphate Gels for Bone Regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research A* 102(3),808-817.

Amiri N, Ajami, S, Shahroodi A, Jannatabadi N, Darban SA, Bazzaz BSF, Movaffagh J (2020) Teicoplanin-Loaded Chitosan-PEO Nanofibers for Local Antibiotic Delivery and Wound Healing. *International Journal of Biological Macromolecules* 162: 645-656.

Anugraha, A, Hughes LD, Pillai A (2019) A Novel Technique for Fabricating Antibiotic-Coated Intramedullary Nails Using an Antibiotic-Loaded Calcium Sulphate Hydroxyapatite Bio-Composite, Cerament-V. *Journal of Surgical Case Reports* 11:1-4.

Aslanov T, Uzunoğlu D, Özer A (2017) Synthesis of Hydroxyapatite-Alginate Composite: Methylene Blue Adsorption. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 2(1), 37-47.

Bang LT, Long BD, Othman R (2014) Carbonate Hydroxyapatite and Silicon-Substituted Carbonate Hydroxyapatite: Synthesis, Mechanical Properties, and Solubility Evaluations. *The Scientific World Journal* 2014(3).

Bang LT, Ramesh S, Purbolaksono J, Ching YC, Long BD, Chandran H, Othman R (2015) Effects of Silicate and Carbonate Substitution on the Properties of Hydroxyapatite Prepared By Aqueous Co-Precipitation Method. *Materials and Design* 87:788-796.

Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P (2012) Normal Bone Physiology, Remodelling and Its Hormonal Regulation. *Surgery* 30(2),47-53.

Bi Y, Lin Z, Deng S (2019) Fabrication and Characterization of Hydroxyapatite/Sodium Alginate/Chitosan Composite Microspheres for Drug Delivery and Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering* 100: 576-583.

Boanini E, Gazzano M, Bigi A (2010) Ionic Substitutions in Calcium Phosphates Synthesized at Low Temperature. *Acta Biomaterialia* 6:1882-1894.

Boontheekul T, Kong HJ, Mooney DJ (2005) Controlling Alginate Gel Degradation Utilizing Partial Oxidation and Bimodal Molecular Weight Distribution. *Biomaterials*, 26(15), 2455-2465.

Boyras D, Nalbant H (2015) Comparison of Zeolite (Clinoptilolite) with Diatomite and Pumice as Soil Conditioners in Agricultural Soils. Article in *Pakistan Journal of Agricultural Research* 52(4), 923-929.

Cazalbou S, Eichert D, Ranz X, Drouet C, Combes C, Harmand MF, Rey C (2005) Ion Exchanges in Apatites for Biomedical Applications. *Journal of Materials Science: Materials In Medicine* 16 (2005),405– 409.

Chang SCN, Rowley JA, Tobias G, Genes NG, Roy AK, Mooney DJ, Bonassar LJ (2001) Injection Molding of Chondrocyte/Alginate Constructs in the Shape of Facial Implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 4:503-511.

Chang SCN, Tobias G, Roy AK, Vacanti A, Bonassar LJ (2003) Tissue Engineering of Autologous Cartilage for Craniofacial Reconstruction by Injection Molding. *Plastic and Reconstructive Surgery* 112(3), 793-799.

Clarke B (2008) Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3:131–139.

Darr JA, Guo ZX, Raman V, Bououdina M, Rehman IU (2004) Metal Organic Chemical Vapour Deposition (MOCVD) of Bone Mineral Like Carbonated Hydroxyapatite Coatings. *Chemical Communications* 4(6), 696-697.

Davis H, Leach J (2008) Hybrid and Composite Biomaterials in Tissue Engineering. Topics in Multifunctional Biomaterials and Devices 10:1-26.

De Aza PN, De Aza AH, De Aza S (2005) Crystalline Bioceramic Materials. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio 44(3), 135-145

Dinçer İ, Orhan A, Çoban S, (2015) Pomza Araştırma ve Uygulama Merkezi Fizibilite Raporu; Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Jeoloji Mühendisliği Bölümü.

Dong Y, Dong W, Cao Y, Han Z, Ding Z (2011) Preparation and Catalytic Activity of Fe Alginate Gel Beads for Oxidative Degradation of Azo Dyes Under Visible Light Irradiation. Catalysis Today 75: 346-355.

Dorati R, DeTrizi, A, Modena T, Conti B, Benazzo F, Gastaldi G, Genta I (2017) Biodegradable Scaffolds for Bone Regeneration Combined with Drug-Delivery Systems in Osteomyelitis Therapy. Pharmaceuticals 10(4).

Dorozhkin S. (2011) Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics. BIO 1(1), 1-51.

Draget KI, Taylor C (2011) Chemical, Physical and Biological Properties of Alginates and Their Biomedical Implications. Food Hydrocolloids 25(2), 251-256.

Drago L, Romanò D, De Vecchi E, Vassena C, Logolus, N, Mattina R, Romanò CL (2013) Bioactive Glass BAG-S53P4 for the Adjunctive Treatment of Chronic Osteomyelitis of the Long Bones: an In Vitro And Prospective Clinical Study 13:584.

Du M, Chen J, Liu K, Xing H, Song C (2021). Recent Advances In Biomedical Engineering of Nano-Hydroxyapatite Including Dentistry, Cancer Treatment and Bone Repair. Composites Part B: Engineering 215 (2021).

Elaissi A, Alibi H, Ghith A (2022) Effect of Pumice Stone and Pearlite Abrasives Characteristics on Denim Abrasion. Journal of Composite Materials, 56(13), 2107-2116.

Evcin A, Özdem M (2019) Cam Fiberle Güçlendirilmiş Hidroksiapatit Üretimi. Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering, 19(1), 170-176.

Fang B, Qiu P, Xia C, Cai D, Zhao C, Chen Y, Lin X (2021) Extracellular Matrix Scaffold Crosslinked with Vancomycin for Multifunctional Antibacterial Bone Infection Therapy. *Biomaterials* 268.

Fillingham Y, Jacobs J (2016) Bone Grafts and Their Substitutes. *Bone Joint J* 98(1), 6–9.

Fölsch C, Bok J, Krombach GA, Rickert M, Ulloa CAF, Ahmed GA, Jahnke A (2020) Influence of Antibiotic Pellets on Pore Size and Shear Stress Resistance of Impacted Native and Thermoinfected Cancellous Bone: An In Vitro Femoral Impaction Bone Grafting Model. *Journal of Orthopaedics* 22: 414-421.

Fragoso LSM, Lima DANL, De Alexandre R., Bertoldo CES, Aguiar FHB, Lovadino JR (2011) Evaluation of Physical Properties of Enamel After Microabrasion, Polishing, and Storage In Artificial Saliva. *Biomedical Materials* 6(3).

Gholizadeh BS, Buazar, F, Hosseini, SM, Mousavi SM (2018) Enhanced Antibacterial Activity, Mechanical and Physical Properties of Alginate/Hydroxyapatite Bionanocomposite Film. *International Journal of Biological Macromolecules* 116:786-792.

Gimeno M, Pinczowski P, Vázquez FJ, Pérez M, Santamaría J, Arruebo M, Luján L (2013) Porous Orthopedic Steel Implant as an Antibiotic Eluting Device: Prevention of Post-Surgical Infection on an Ovine Model. *International Journal of Pharmaceutics* 452(1-2), 166-172.

Ginebra MP, Espanol M, Maazouz Y, Bergez V, Pastorino D (2018) Bioceramics and Bone Healing. *Efort Open Reviews* 3(5),173-183.

Gombotz WR, Wee S (1998) Protein Release from Alginate Matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* (C. 31).

Götz HE, Müller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R (2004) Effect of Surface Finish on the Osseointegration of Laser-Treated Titanium Alloy Implants. *Biomaterials*, 25(18),4057-4064.

Gupta S, Panneer Selvam S, Ramadoss R, Sundar S (2025) Alginate-Hydroxyapatite Scaffolds: A Comprehensive Characterization Study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 15(3), 555-562.

Güngör T, Özkan ŞG (2001) Pomza Madenciliğine Genel Bir Bakış. *Journal of Engineering Sciences* 7(2),269-276.

Hacker MC, Mikos AG. (2010) Synthetic Polymers. *Principles of Regenerative Medicine*, Second Edition (ss. 587-622). Elsevier.

Hench L (1991) Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 74(7),1478-1510.

Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA (2009) Local Communication on and Within Bone Controls Bone Remodeling. *Bone* 44 (2009),1026–1033.

Hing KA, Annaz B, Saeed S, Revell PA, Buckland T (2004) Microporosity Enhances Bioactivity of Synthetic Bone Graft Substitutes. *Journal of Materials Science: Materials In Medicine* 16 (2005) 467– 475.

Hing KA, Saeed S, Annaz B, Buckland T, Revell PA (2004) Microporosity Affects Bioactivity of Macroporous Hydroxyapatite Bone Graft Substitutes. *Key Engineering Materials* (C. 254-256, ss. 273-276).

Holzwarth JM, Ma PX (2011) Biomimetic Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* 32(36), 9622–9629.

Huang CL, Fang W, Huang BR, Wang YH, Dong GC, Lee TM (2020) Bioactive Glass as a Nanoporous Drug Delivery System for Teicoplanin. *Applied Sciences* 10(7).

Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH (1970) Potential of Ceramic Materials as Permanently Implantable Skeletal Prostheses. *Ceramic Materials* 4, 433-456.

İnan U, Göktürk E (2011) Allogreftler. *TOTBİD Dergisi* 10(2),168-173.

İnsal B, Pişkin İ (2017) Kemik Dokusunun Fizyolojisi Etlik Vet Mikrobiyol Dergisi 28 (1),28-32.

Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA (2016) Biomaterials Approaches to Treating Implant-Associated Osteomyelitis. Biomaterials 81 (2016), 58-71.

Iswarya S, Theivasanthi T, Gopinath SCB (2023) Sodium Alginate/Hydroxyapatite/Nanocellulose Composites: Synthesis and Potentials for Bone Tissue Engineering. Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 148 (2023).

Jia WT, Fu Q, Huang WH, Zhang CQ, Rahaman MN (2015) Comparison of Borate Bioactive Glass and Calcium Sulfate as Implants for The Local Delivery of Teicoplanin in The Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus-Induced Osteomyelitis in a Rabbit Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(12), 7571-7580.

Juhasz JA, Best SM (2012) Bioactive Ceramics: Processing, Structures and Properties. Journal of Materials Science 47:610–624.

Kahdestani SA, Shahriari MH, Abdouss M (2021) Synthesis and Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Teicoplanin Using Sol–Gel. Polymer Bulletin, 78(2), 1133-1148.

Kannan S, Lemos AF, Ferreira JMF (2006) Synthesis and Mechanical Performance of Biological-Like Hydroxyapatites. Chemistry of Materials, 18(8), 2181-2186.

Katsimbri, P. (2017) The Biology of Normal Bone Remodelling. European Journal of Cancer Care. 26(6),s.e12740.

Kazimoglu C, Karapinar H, Sener M, Afsar İ, Sener AG, Akgün U (2008) In Vitro Evaluation of Gentamicin and Teicoplanin Release from Cancellous Human Bone. Acta Orthop Traumatol Turc 42(1):64-69.

Kılınc Aksay E, Akar A, Cöcen İ (2016) The Preparation and Enrichment of Pumice Ore. Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering, 16(2):384-390.

Kiliç S, Pazarci Ö, Keklikcioğlu Çakmak N, Taş A (2020) Does the Addition of Poly(Glycolide-Co-Lactide) to Teicoplanin-Containing Poly(Methyl Methacrylate) Beads Change The Elution Characteristics. *Indian Journal of Orthopaedics*, 54, 71-75.

Kirschner CM, Anseth KS (2013) Hydrogels In Healthcare: From Static to Dynamic Material Microenvironments. *Acta Materialia*, 61(3), 931-944.

Kocak FZ (2021) Smart pH and Thermosensitive Injectable Hydrogels: Chitosan-Hydroxyapatite-Heparin Based Functionalised Biomaterials for Bone Regeneration. Lancerter University, Doctoral Thesis, s.1-251, United Kingdom .

Kocak FZ, Yar M, Rehman IU (2024) In Vitro Degradation, Swelling, and Bioactivity Performances of in Situ Forming Injectable Chitosan-Matrixed Hydrogels for Bone Regeneration and Drug Delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, 121(9): 2767-2779.

Kokubo T, Takadama H (200) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915.

Komur B, Lohse T, Can H, Khalilova G, Geçimli Z, Aydoğdu M, Gunduz O (2016) Fabrication of Naturel Pumice/Hydroxyapatite Composite for Biomedical Engineering. *Biomedical Engineering Online*, 15(1).

Kumar RA. Sivashanmugam A, Deepthi S, Iseki S, Chennazhi KP, Nair SV Jayakumar R (2015) Injectable Chitin-Poly(ε-Caprolactone)/Nano Hydroxyapatite Composite Microgels Prepared by Simple Regeneration Technique for Bone Tissue Engineering *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(18): 9399–9409.

Kuriakose TA, Palanichamy M, Arivuoli D, Dierks K, Bocelli G, Betzel C (2004) Synthesis of Stoichiometric Nano Crystalline Hydroxyapatite By Ethanol- Based Sol-Gel Technique at Low Temperature. *Journal of Crystal Growth*, 263(1-4), 517-523.

Kuzielová E, Palou MT, Lutišanová G, Palou MT, Kozánková J (2011) Static and Dynamic In Vitro Test of Bioactivity Of Glass Ceramics. *Ceramics-Silikáty* 55(2), 106-113.

Lalidou F, Kolios G, Drosos G (2014) Bone Infections and Bone Graft Substitutes for Local Antibiotic Therapy. *Surg Technol Int* 24:353-62.

Landi E, Celotti G, Logroscino G, Tampieri A (2003) Carbonated Hydroxyapatite as Bone Substitute. *Journal of The European Ceramic Society*, 23(15), 2931-2937.

Landi E, Tampieri A, Mattioli-Belmonte M, Celotti G, Sandri M, Gigante A, Biagini, G (2006) Biomimetic Mg- And Mg, CO₃-Substituted Hydroxyapatites: Synthesis Characterization And In Vitro Behaviour. *Journal Of The European Ceramic Society*, 26(13), 2593-2601.

Latifi SM, Fathi M, Sharifnabi A, Varshosaz J (2017) In Vitro Characterisation of a Sol-Gel Derived In Situ Silica-Coated Silicate and Carbonate Co-Doped Hydroxyapatite Nanopowder for Bone Grafting. *Materials Science and Engineering* 75:272-278.

Lee KY, Mooney DJ (2012) Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science* 37(2012),106– 126.

Lee KY, Peters MC, Mooney DJ (2003) Comparison Of Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor on Angiogenesis in SCID Mice. *Journal of Controlled Release*. 87, Ss. 49-56).

Lew KS, Othman R, Ishikawa K, Yeoh FY (2012) Macroporous Bioceramics: A Remarkable Material for Bone Regeneration. *Journal of Biomaterials Applications*, 27(3), 345-358.

Li H, Chang J (2013) Stimulation of Proangiogenesis by Calcium Silicate Bioactive Ceramic. *Acta Biomaterialia*, 9(2), 5379-5389.

Li X, Yang W, Zou Q, Zuo Y (2010) Investigation on Microstructure, Composition, and Cytocompatibility of Natural Pumice for Potential Biomedical Application. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 16(3), 427-434.

Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M (2005) Chitosan-Alginate Hybrid Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, 26(18), 3919-3928.

Lin C, Metters AT (2006) Hydrogels in Controlled Release Formulations: Network Design and Mathematical Modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (2006),1379–1408.

Lin K, Chen L, Chang J (2012) Fabrication of Dense Hydroxyapatite Nanobioceramics with Enhanced Mechanical Properties Via Two-Step Sintering Process. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 9(3), 479-485.

Lin WC, Yao C, Huang TY, Cheng SJ, Tang CM (2019) Long-Term In Vitro Degradation Behavior and Biocompatibility of Polycaprolactone/Cobalt-Substituted Hydroxyapatite Composite for Bone Tissue Engineering. *Dental Materials*, 35(5), 751-762.

Liu D, He C, Liu Z, Xu W (2017) Gentamicin Coating of Nanotubular Anodized Titanium Implant Reduces Implant-Related Osteomyelitis and Enhances Bone Biocompatibility in Rabbits. *International Journal of Nanomedicine*, 12:5461-5471.

Liu Q, Huang S, Matinlinna JP, Chen Z, Pan H (2013) Insight Into Biological Apatite: Physicochemical Properties and Preparation Approaches. *Biomed Research International* Volume 2013, Article ID:929748.

Liu Q, Xue Y, Guo J, Tao L, Zhu Y (2024) Citrate: A Key Signalling Molecule and Therapeutic Target for Bone Remodeling Disorder. *Frontiers in Endocrinology*, 15: 1512398.

Logeart-Avramoglu D, Anagnostou F., Bizios R, Petite H (2005) Engineering Bone: Challenges and Obstacles. *J. Cell. Mol.Med.*, 9: 72-84.

Lu HH, El-Amin SF, Scott KD, Laurencin CT (2003) Three-Dimensional, Bioactive, Biodegradable, Polymer-Bioactive Glass Composite Scaffolds with Improved Mechanical Properties Support Collagen Synthesis and Mineralization of Human Osteoblast-Like Cells In Vitro. *Polymer–Bioactive Glass Composite Scaffolds* 64A(3): 465-474.

Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M (2008) Endochondral Ossification: How Cartilage is Converted Into Bone in The Developing Skeleton. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 40(1):46–62.

Mahmoudian M, Ganji F (2017) Vancomycin-Loaded HPMC Microparticles Embedded within Injectable Thermosensitive Chitosan Hydrogels. *Progress in Biomaterials*, 6(1-2), 49-56.

Maier GS, Roth KE, Andereya S, Birnbaum K, Niedhart C, Lühmann M, Maus U (2013) In Vitro Elution Characteristics of Gentamicin and Vancomycin from Synthetic Bone Graft Substitutes. *The Open Orthopaedics Journal*, 7(1), 624-629.

Manjula B, Varaprasad K, Sadiku R, Raju KM (2013). Preparation and Characterization of Sodium Alginate-Based Hydrogels and Their In Vitro Release Studies. *Advances in Polymer Technology*, 32(2).

Maolin Z, Jun L, Min Y, Hongfei H (2000). The Swelling Behavior of Radiation Prepared Semi-Interpenetrating Polymer Networks Composed of PolyNIPAAm And Hydrophilic Polymers. *Radiation Physics and Chemistry* 58 (2000), 397-400.

Marrubini G, Tengattini S, Colombo R, Bianchi D, Carlotti F, Orlandini S, Massolini G (2019) A New MS Compatible HPLC-UV Method for Teicoplanin Drug Substance and Related Impurities, Part 1: Development and Validation Studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, 185-191.

Martin RB, Burr DB, Sharkey NA, Fyhrie DP (2015) *Skeletal Biology. Skeletal Tissue Mechanics* (ss. 35-93). Springer New York.

Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, Yamaguchi S, Kusunose T, Toyonaga T, Takahashi J (2004) Hydroxyapatite Particles as a Controlled Release Carrier of Protein. *Biomaterials*, 25(17), 3807-3812.

Mauffrey C, Butler N, Hake M. (2016) Fabrication of an Interlocked Antibiotic/Cement-Coated Carbon Fiber Nail for the Treatment of Long Bone Osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Trauma* 30:23–24.

Mohan Raj R, Priya P, Raj V (2018) Gentamicin-Loaded Ceramic-Biopolymer Dual Layer Coatings on The Ti with Improved Bioactive and Corrosion Resistance Properties for Orthopedic Applications. *Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 82, 299-309.

Motasadzadeh H, Tavakoli M, Damoogh S, Mottaghtalab F, Gholami M, Atyabi F, Dinarvand R (2022) Dual Drug Delivery System of Teicoplanin and Phenamil Based On Ph-Sensitive Silk Fibroin/Sodium Alginate Hydrogel Scaffold for Treating Chronic Bone Infection. *Biomaterials Advances*, 139(2022) 213032.

Mourhly A, Khachani M, El Hamidi A, Kacimi M, Halim M, Arsalane S (2015) The Synthesis And Characterization of Low-Cost Mesoporous Silica SiO₂ from Local Pumice Rock. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 5:35,doi: 10.5772/62033.

Murray BE, Arias CA, Nannini EC (2014) Glycopeptides (Vancomycin and Teicoplanin), Streptogramins (Quinupristin-Dalfopristin), Lipopeptides (Daptomycin), and Lipoglycopeptides (Telavancin). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* 1:377-400.

Norton J, Malik KR, Darr J.A, Rehman, IU (2006) Recent Developments in Processing and Surface Modification of Hydroxyapatite. *Advances in Applied Ceramics* 105(3),113-139.

O'Brein FJ (2011) Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials Today* 14(3):89-95.

Okada M, Furuzono T (2012) Hydroxylapatite Nanoparticles: Fabrication Methods and Medical Applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 13 (2012) 064103.

Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, Gower LB (2007) Bone Structure and Formation: A New Perspective. *Materials Science and Engineering R: Reports* 58 (2007),77–116.

Orive G, Ponce S, Hernandez RM, Gasc AR, Igartua M, Pedraz JL (2002) Biocompatibility of Microcapsules for Cell Immobilization Elaborated with Different Type of Alginates. *Biomaterials* 23, 3825–3831.

Özdemir Küçükçapraz D, Üçgül İ, Elibüyük U (2016) Alginatlar ve Tekstilde Lif Uygulamaları. *ANKA e-DERGİ* 1(1).

Parhi P, Ramanan A, Ray AR (2006) Preparation and Characterization of Alginate and Hydroxyapatite-Based Biocomposite. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(6), 5162-5165.

Passoni MH, Salgado HRN (2012) Development And Validation of a New and Rapid HPLC for Determination of Lyophilized Teicoplanin. *Analytical Methods*, 4(6), 1560-1564.

Pavel M, David J, Otakar N, Eva K, Vladislav B, Ivan L, Antonín, S. (2012) Bone Grafts as a Vancomycine Carrier for Local Therapy of Resistant Infections. *57*: 459-462.

Pawar SN, Edgar KJ (2012) Alginate Derivatization: A Review of Chemistry, Properties and Applications. *Biomaterials* 33 (2012) 3279-3305.

Peng KT, Chen CF, Chu IM, Li YM, Hsu WH, Hsu RWW, Chang PJ (2010) Treatment of Osteomyelitis with Teicoplanin-Encapsulated Biodegradable Thermosensitive Hydrogel Nanoparticles. *Biomaterials*, 31(19), 5227-5236.

Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H (2000) Hydrogels In Pharmaceutical Formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 27-46.

Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M (2007) Silicon Substitution In The Calcium Phosphate Bioceramics. *Biomaterials* 28(2007) ,4023–4032.

Posadowska U, Brzychczy-Włoch M, Drozd A, Krok-Borkowicz M, Włodarczyk-Biegun M, Dobrzyński P, Pamuła E (2016) Injectable Hybrid Delivery System Composed of Gellan Gum, Nanoparticles and Gentamicin for The Localized Treatment of Bone Infections. *Expert Opinion on Drug Delivery* 13(5), 613-620.

Pushpalatha C, Gayathri VS, Sowmya SV, Augustine D, Alamoudi A, Zidane B, Bhandi S (2023) Nanohydroxyapatite In Dentistry: A Comprehensive Review". *Saudi Dental Journal*, 35(6), 741-752.

Queen D, Orsted H, Sanada H, Sussman G (2004) A Dressing History. *International Wound Journal* 1(1),59-77.

Raggatt LJ, Partridge NC (2010) Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *Journal of Biological Chemistry* 285(33),25103-25108.

Rashad AM (2019) A Short Manual on Natural Pumice as a Lightweight Aggregate. *Journal of Building Engineering* 25 (2019):100802.

Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ, Thompson RPH, Hampson GN (2003) Orthosilicic Acid Stimulates Collagen Type 1 Synthesis and Osteoblastic Differentiation In Human Osteoblast-Like Cells In Vitro. *Bone*, 32(2), 127-135.

Rehm I, Bonfield W (1997) Characterization of Hydroxyapatite and Carbonated Apatite By Photo Acoustic FTIR Spectroscopy. *Journal Of Materials Science: Materials in Medicine* 8:1-4.

Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ (2001) Polymeric System for Dual Growth Factor Delivery. *Nature Biotechnology* 19:1029-1034.

Rizwan M, Yahya R, Hassan A, Yar M, Azzahari AD, Selvanathan V, Abouloula C N (2017) Ph Sensitive Hydrogels In Drug Delivery: Brief History, Properties, Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications. *Polymers*. 9(137).

Roger S, Talbot D, Bee A (2006) Preparation And Effect of Ca^{2+} On Water Solubility, Particle Release and Swelling Properties of Magnetic Alginate Films. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 305(1), 221-227.

Ruiz-Agudo E, Ruiz-Agudo C, Di Lorenzo F, Alvarez-Lloret P, Ibañez-Velasco A, Rodriguez-Navarro C (2021) Citrate Stabilizes Hydroxylapatite Precursors: Implications for Bone Mineralization. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 7(6), 2346-2357.

Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A (2013) Synthesis Methods for Nanosized Hydroxyapatite with Diverse Structures. *Acta Biomaterialia*, 9(8), 7591-7621.

Sahar ND, Hong SI, Kohn DH (2005) Micro- and Nano-Structural Analyses of Damage In Bone. *Micron* 36:617–629.

Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004) Bone Tissue Engineering: State of The Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience*, 4(8),743-765.

Salleh KM, Zakaria S, Sajab MS, Gan S, Chia CH, Jaafar SNS, Amran UA (2018) Chemically Crosslinked Hydrogel and Its Driving Force Towards Superabsorbent Behaviour. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1422-1430.

Samadian H, Vahidi R, Salehi M, Hosseini-Nave H, Shahabi A, Zanganeh S, Parsa MJM (2023) Hydrogel Nanocomposite Based on Alginate/Zeolite for Burn Wound Healing: In Vitro And In Vivo Study. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 26(6), 708-716.

Sánchez-Díaz JC, Martínez-Ruvalcaba A, Ortega-Gudiño P, González-Álvarez A, Mendizábal E, Puig JE (2006) Determination of The Diffusion Coefficients In The Ascorbic Acid Delivery From Nanostructured-Polyacrilamide Hydrogels. *Polymer Bulletin*, 56(4-5), 437-446.

Sathiyavimal S, Vasantharaj S, LewisOscar, F., Selvaraj R, Brindhadevi K, Pugazhendhi A (2020) Natural Organic and Inorganic–Hydroxyapatite Biopolymer Composite for Biomedical Applications. *Progress in Organic Coatings* 147(2020): 105858.

Sayed M, Mahmoud EM, Saber SM, Raafat SN, Gomaa SM, Naga SM (2023) Effect of The Injectable Alginate/ Nano-Hydroxyapatite and The Silica/ Nano-Hydroxyapatite Composites on The Stem Cells: A Comparative Study. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 610(2023) 122327.

Sayet G, Sinigre M, Ben Reguiga M (2014) Development Of A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Coupled to UV-Visible Analysis Technique for Aminositides and Glycopeptides Quantitation in Antibiotic Locks. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 72(1), 41-50.

Shahid,U, Nisar A, Rehman MAU, Omer S, Tayyaba Q, Shafique MA, Iqbal S (2023) Development of a Ce-Doped Hydroxyapatite-Sodium Alginate Biocomposite for Bone and Dental Implants. *New Journal of Chemistry*, 47(15), 7217-7224.

Shepherd JH, Shepherd DV, Best SM (2012) Substituted Hydroxyapatites for Bone Repair. *Journal of Materials Science: Materials In Medicine* 23,2335-2347.

Silva EA, Mooney DJ (2010) Effects of Vegf Temporal and Spatial Presentation on Angiogenesis. *Biomaterials*, 31(6), 1235-1241.

Singh J, Chatha SS, Singh H (2021) Characterization and Corrosion Behavior of Plasma Sprayed Calcium Silicate Reinforced Hydroxyapatite Composite Coatings for Medical Implant Applications. *Ceramics International*, 47(1), 782-792.

Singhal R, Gupta K (2015) A Review: Tailor-made Hydrogel Structures (Classifications and Synthesis Parameters). *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 55(1), 54-70.

Son KD, Yang DJ, Kim MS, Kang IK, Kim SY, Kim YJ (2012) Effect of Alginate as Polymer Matrix on The Characteristics of Hydroxyapatite Nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 132(2-3), 1041-1047.

Sopyan I, Mel M, Ramesh S, Khalid KA (2007) Porous Hydroxyapatite for Artificial Bone Applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 8(1-2), 116-123.

Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT (2008) A Review of Materials, Fabrication Methods, and Strategies Used to Enhance Bone Regeneration in Engineered Bone Tissues. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 85(2), 573-582.

Stevens M (2008). *Biomaterials for Bone Tissue Engineering*. *Materials Today* 11(5), 18-25.

Subuki I, Kamarulzaman A, Dahlan N.(2020) In-Vitro Assessment of Synthesized Hydroxyapatite Specimen in Simulated Body Fluid (SBF). *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering*, 4(9), 2782-2786.

Sun D, Chen Y, Tran RT, Xu S, Xie D, Jia C, Bai X (2014) Citric Acid-Based Hydroxyapatite Composite Scaffolds Enhance Calvarial Regeneration. *Scientific Reports*, 4(1):6912. Available at: doi: 10.1038/srep06912.

Swamy TMM, Ramaraj B, Siddaramaiah (2010) Sodium Alginate and Poly(Ethylene Glycol) Blends: Thermal and Morphological Behaviors. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 47(9), 877-881.

Tan H, Marra KG (2010) Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3), 1746-1767.

Tapia MS, Rojas-Graü MA, Rodríguez FJ, Ramírez J, Carmona A, Martín-Belloso O (2007) Alginate- and Gellan-Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh-Cut Fruits. *Journal of Food Science*, 72(4).

Taşdelen B (2018). Preparation, Characterization and Drug Release Properties Polyvinyl Alcohol and Polyvinyl Pyrrolidone Blended Hydrogels. *European Journal of Engineering and Applied Sciences.*, 1(1), 27-30.

Tonnesen HH, Karlsen J (2002) Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6), 621–630.

Tuncay ÖE (2013) Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Ucak S, Sudagidan M, Borsa BA, Mansuroglu B, Ozalp VC (2020) Inhibitory Effects of Aptamer Targeted Teicoplanin Encapsulated PLGA Nanoparticles for Staphylococcus Aureus Strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(5),69.

Ullah F, Othman MBH, Javed F, Ahmad Z, Akil HM (2015) Classification, Processing and Application of Hydrogels: A Review. *Materials Science and Engineering* 57:414-433.

Varadavenkatesan, T, Vinayagam R, Pai S, Kathirvel B, Pugazhendhi A, Selvaraj R (2021) Synthesis, Biological and Environmental Applications of Hydroxyapatite and Its Composites with Organic and Inorganic Coatings. *Progress in Organic Coatings* 151 (2021):106056.

Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang KH, Kim SK (2015) Alginate Composites for Bone Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* 72: 269-281.

Wang G, Luo W, Zhou Y, Zhu Z, Zhao Z, Liu S, Zhang Y (2021) Custom-Made Antibiotic Cement-Coated Nail for the Treatment of Infected Bone Defect. *BioMed Research International*, 2021, Article ID 6693906.

Wassif RK, Elkayal M, Shamma RN, Elkheshen SA (2021) Recent Advances in The Local Antibiotics Delivery Systems for Management of Osteomyelitis. *Drug Delivery*, 28(1), 2392-2414.

Wei G, Ma PX (2004) Structure And Properties of Nano-Hydroxyapatite/Polymer Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, 25(19), 4749-4757.

Wei S, Ma JX, Xu L, Gu XS, Ma XL (2020) Biodegradable Materials for Bone Defect Repair. *Military Medical Research* 7(54).

Wong JY, Bronzino JD (2007) *Biomaterials*. CRC Press. New York.

Wu Z, Su X, Xu Y, Kong B, Sun W, Mi S (2016) Bioprinting Three-Dimensional Cell-Laden Tissue Constructs with Controllable Degradation. *Scientific Reports*, 6(1):24474.

Wulandari W, Islami DM, Wellia DV, Emriadi E, Sisca V, Jamarun N (2023) The Effect of Alginate Concentration on Crystallinity, Morphology, and Thermal Stability Properties of Hydroxyapatite/Alginate Composite. *Polymers*, 15(3),614.

Xia L, Yin Z, Mao L, Wang X, Liu J, Jiang X, Fang B (2016) Akermanite Bioceramics Promote Osteogenesis, Angiogenesis and Suppress Osteoclastogenesis for Osteoporotic Bone Regeneration. *Scientific Reports*, 6:22005. doi: 10.1038/srep22005.

Yang L, Chu J, Fix J (2002) Colon-Specific Drug Delivery: New Approaches and in Vitro/In Vivo Evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 235:1–15.

Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie ABM (2012) The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Ossification. *International Journal of Oral Science*, 4(2),64-68.

Yar M, Shahzad S, Siddiqi S A, Mahmood N, Rauf A, Anwar MS, Rehman IU (2015) Triethyl Orthoformate Mediated a Novel Crosslinking Method for The Preparation

Of Hydrogels For Tissue Engineering Applications: Characterization and In Vitro Cytocompatibility Analysis. *Materials Science And Engineering* 56: 154-164.

Yin M, Xu F, Ding H, Tan F, Song F, Wang J (2015) Incorporation of Magnesium Ions Into Photo-Crosslinked Alginate Hydrogel Enhanced Cell Adhesion Ability. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(9), 1088-1092.

Yücel S, Aydın I, Özçimen D, Tekerek BS, Yildirim Ö, Kabakci A (2012) Effect Of Simulated Body Fluid on The Behaviour of Artificial Bone Composite Material Extended By Hydroxyapatite and Silicate Powders. *e Key Engineering Materials*, 493-494,159-165.

Zakaria SM, Sharif Zein SH, Othman MR, Yang F, Jansen J A (2013) Nanophase Hydroxyapatite as a Biomaterial in Advanced Hard Tissue Engineering: A Review. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* 19(5), 431-441.

Zhai W, Lu H, Chen L, Lin X, Huang Y, Dai K, Chang J (2012) Silicate Bioceramics Induce Angiogenesis During Bone Regeneration. *Acta Biomaterialia* 8(1), 341-349.

Zhang J, Hurren C, Lu Z, Wang D (2022) Ph-Sensitive Alginate Hydrogel for Synergistic Anti-Infection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 222, 1723-1733.

Zhang J, Wang Q, Wang A (2010) In Situ Generation of Sodium Alginate/Hydroxyapatite Nanocomposite Beads as Drug-Controlled Release Matrices. *Acta Biomaterialia*, 6(2), 445-454.

Zhou J, Zhou X G, Wang JW, Zhou H, Dong J (2018) Treatment of Osteomyelitis Defects by Avancymycin-Loaded Gelatin/ β -Tricalciumphosphate Composite Scaffold. *Bone & Joint Research* 7:46-57.