

**ZOLEDRONİK ASİT MODİFİYE
STRONSIYUM/HİDROKSİAPATİT NANOPARTİKÜL
İÇEREN HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF ZOLEDRONIC ACID MODIFIED
HYDROXYAPATITE/STRONTIUM NANOPARTICLES
CONTAINING HYDROGEL**

ALKİN ÖZGEN

PROF. DR. HALİL MURAT AYDIN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

2025

Aileme...



ÖZET

ZOLEDRONİK ASİT MODİFİYE STRONSIYUM/HİDROKSİAPATİT NANOPARTİKÜL İÇEREN HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Alkin ÖZGEN

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN
Ocak 2025, 83 Sayfa

Bu doktora tezi kapsamında zoledronik asit/stronsiyum hidroksiapatit nanopartiküller ve karboksimetil kitosan/oksiteilenmiş dekstran (CMC/OD) hidrojellerinden oluşan yeni tip nanokompozit hidrojeller çalışılmıştır. Saf hidroksiapatit, %5, %10 ve %15 (a/a) stronsiyum ikameli stronsiyum hidroksiapatit nanopartiküller üretilmiş ve %5 ile %7,5 (a/a) oranlarında zoledronik asit ile modifiye edilmiştir. Modifiye edilmiş stronsiyum hidroksiapatit nanopartiküller CMC/OD hidrojellerine dahil edilmiştir. Zoledronik asit modifiye edilmiş stronsiyum hidroksiapatit nanopartiküller Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektroskopisi (EDS) ve X-Işını Kırınımı (XRD) ile karakterize edilmiştir. CMC/OD hidrojellerin kimyasal özellikleri Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Analizi (FTIR) ve SEM analizi ile incelenmiştir. CMC/OD hidrojellerin fiziksel özellikleri bozunma davranışı ve reolojik ölçümlerle belirlenmiştir. Hücre-malzeme etkileşimleri *in vitro* araştırılmıştır. Sonuçlar, hidroksiapatit nanopartiküllerinin CMC/OD hidrojellere dahil edilmesinin reolojik özellikleri önemli ölçüde iyileştireceğini göstermiştir. Hidroksiapatit nanopartiküllerine stronsiyum eklenmesi hücre çoğalmasında önemli ölçüde artırmıştır. Zoledronik asit modifikasyonu ile birlikte alkalen fosfataz (ALP) ve kalsiyum birikiminde önemli bir artış gözlenmiştir. Sonuç olarak, zoledronik asit modifiyeli stronsiyum hidroksiapatit içeren

CMC/OD nanokompozit hidrojeller, hedeflenen bölgelere kolayca enjekte edilebilme yeteneği, enfeksiyonları önleyici güçlü bir antibakteriyel aktivite, doku rejenerasyonunu ve onarımını destekleyen kendi kendini iyileştirme yetenekleri gibi üstün özellikleri nedeniyle ortopedik ve kraniyofasiyal uygulamalarda potansiyel göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hidroksiapatit, stronsiyum hidroksiapatit, zoledronik asit, kitosan, schiff bazı, enjekte edilebilir hidrojel, antibakteriyel özellik, kemik rejenerasyonu.



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ZOLEDRONIC ACID MODIFIED HYDROXYAPATITE/STRONTIUM NANOPARTICLES CONTAINING HYDROGEL

Alkin ÖZGEN

PhD, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

January 2025, 83 Pages

Within the scope of this doctoral thesis, new types of nanocomposite hydrogels consisting of zoledronic acid/strontium hydroxyapatite nanoparticles and carboxymethyl chitosan/oxidised dextran (CMC/OD) hydrogels were studied. Pure hydroxyapatite, 5%, 10% and 15% (w/w) strontium substituted strontium hydroxyapatite nanoparticles were produced and modified with zoledronic acid at ratios of 5% to 7,5% (w/w). The modified strontium hydroxyapatite nanoparticles were incorporated into CMC/OD hydrogels. Zoledronic acid modified strontium hydroxyapatite nanoparticles were characterised by Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) and X-Ray Diffraction (XRD). The chemical properties of CMC/OD hydrogels were investigated by Fourier Transform Infrared Analysis (FTIR) and SEM analysis. The physical properties of CMC/OD hydrogels were determined by degradation behaviour and rheological measurements. Cell-material interactions were investigated *in vitro*. The results showed that the incorporation of hydroxyapatite nanoparticles into CMC/OD hydrogels would significantly improve the rheological properties. The addition of strontium to hydroxyapatite nanoparticles significantly enhanced cell proliferation. A significant increase in alkaline phosphatase (ALP) and calcium accumulation was observed with zoledronic acid modification. In conclusion, CMC/OD nanocomposite hydrogels containing zoledronic acid modified strontium hydroxyapatite show potential in orthopaedic and craniofacial applications due to their superior properties such as the ability to be easily injected into targeted areas, a strong antibacterial activity that prevents infections, and self-healing capabilities that promote tissue regeneration and repair.

Keywords: Hydroxyapatite, strontium hydroxyapatite, zoledronic acid, chitosan, schiff base, injectable hydrogel, antibacterial property, bone regeneration.



TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca sağladığı bilgi birikimi, motivasyon ve esirgemediği desteği adına danışmanım Prof. Dr. Halil Murat AYDIN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne FHD-20500 numaralı projeye sağlanan maddi destekten dolayı teşekkürlerimi sunarım. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 1004 - Mükemmeliyet Merkezi Destek Programı - Öncelikli Alanlarda Yüksek Teknoloji Platformları (Proje Numarası: 22AG004, Sağlıklı Yaşam İçin Yeni Nesil Biyomalzeme Teknolojileri Araştırma Ağı) tarafından sağlanan destek için teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Kurulumda yer alan Prof. Dr. Pınar Yılgör HURİ ve Doç. Dr. Soner ÇAKMAK'a çalışmalarına sağladıkları katkılar için teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her anında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Çağatay KARAASLAN, Prof. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK, Prof. Dr. Sedat ODABAŞ, Doç. Dr. Cem BAYRAM ve Dr. Öğr. Üyesi Merve Gültekinoglu BAYRAM'a teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan ve araştırmalarımız üzerine tartışmaktan mutluluk duyduğum Büşra KILIÇ ve Dr. Mohammadreza GHAFARLOU'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarına olan katkılarından dolayı Boğaç KILIÇARSLAN, Selinay ÖZEL, Gökalp BÜYÜKUYSAL, Meryem ERKEN, Hatice YILMAZ, Merve AKMEŞE ve Zeynep ÇAĞLAR'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, desteğini hep hissettiğim aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kemik Dokusu	2
2.2. Kemik Doku Mühendisliği	2
2.3. Kalsiyum Fosfat Bileşikleri	3
2.4. Hidroksiapatit	4
2.4.1. Hidroksiapatit Sentez Yöntemleri	4
2.4.2. Hidroksiapatitin Kullanım Alanları	7
2.5. Bisfosfonatlar	9
2.6. Zoledronik Asit	10
2.7. Kitosan	11
2.7.1. Kitosan Karboksimetilasyonu	11
2.7.2. Kitosanın Biyomühendislikteki Uygulamaları	12
2.8. Dekstran	12
2.8.1. Dekstranın Biyomühendislikteki Uygulamaları	13
2.8.2. Dekstran Oksidasyonu	14
2.9. Enjekte Edilebilir Biyomateryaller	15
2.10. Literatür Araştırmaları	15

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	20
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar	21
3.2. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerin Sentezi ...	21
3.3. Zoledronik Asit Modifiye Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerin Sentezi	22
3.4. Karboksimetil Kitosan Sentezi	22
3.5. Oksitlenmiş Dekstran Sentezi	23
3.6. Karboksimetil Kitosan / Oksitlenmiş Dekstran Hidrojellerin Sentezi	23
3.7. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	24
3.8. Zoledronik Asit Modifiyeli Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	24
3.9. CMC/OD Hidrojellerinin Karakterizasyonu	24
3.9.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	24
3.9.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	25
3.9.3. Reolojik Ölçümler	25
3.9.4. Degredasyon Analizi	25
3.10. Sitouyumluluk Analizi	25
3.10.1. MTT Testi	26
3.10.2. LDH Testi	26
3.10.3. Canlı/Ölü Hücre Boyama	26
3.10.4. Alkalen Fosfataz (ALP) Testi	26
3.10.5. Kalsiyum Birikim Analizi	27
3.10.6. Antibakteriyel Aktivite	27
3.10.7. İstatistiksel Analiz	27
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	28

4.1. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	28
4.1.1. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin SEM Analizi	28
4.1.2. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin EDS Analizi	30
4.1.3. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin XRD Analizi	34
4.2. Zoledronik Asit Modifiye Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	36
4.2.1. Zoledronik Asit Modifiye Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin EDS Analizi	36
4.2.2. Zoledronik Asit Modifiye Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin XRD Analizi	38
4.3. CMC/OD Hidrojellerin Karakterizasyonu	39
4.3.1. CMC/OD Hidrojellerin FTIR Analizi	40
4.3.2. CMC/OD Hidrojellerin SEM Analizi	41
4.3.3. CMC/OD Hidrojellerin Reolojik Analizi	42
4.3.4. CMC/OD Hidrojellerin Biyolojik Degredasyon Analizi	43
4.4. Zoledronik Asit Yüklü Hidrojellerin <i>İn Vitro</i> Sitouyumluluğu	45
4.4.1. MTT Testi	45
4.4.2. LDH Testi	46
4.4.3. Canlı/Ölü Hücre Boyama Testi	47
4.4.4. Alkalen Fosfataz (ALP) Testi	49
4.4.5. Kalsiyum Birikim Analizi	50
4.4.6. Antibakteriyel Aktivite	52
5. SONUÇ	54
6. KAYNAKLAR	55
EKLER	77

EK 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar	77
EK 2 – Tez Çalışması Orijinallik Raporu	81
ÖZGEÇMİŞ	83



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bisfonatların Kimyasal Yapısı	10
Şekil 2.2. Zoledronik Asitin Kimyasal Yapısı	11
Şekil 2.3. Kitosanın Kimyasal Yapısı	11
Şekil 2.4. Kitosanın Karboksimetilasyon Reaksiyonu	12
Şekil 2.5. Dekstranın Kimyasal Yapısı	13
Şekil 2.6. Dekstran Oksidasyonu	14
Şekil 4.1. Hidroksiapatit (HA), HA5Sr, HA10Sr ve HA15Sr Numunelerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri	29
Şekil 4.2. Saf Hidroksiapatit Materyalin Elementel İçeriği ve EDS Görüntü Desenleri	30
Şekil 4.3. %5 Stronsiyum İçeren Hidroksiapatit (HA5Sr) Materyalin Elementel İçeriği Ve EDS Görüntü Desenleri	31
Şekil 4.4. %10 Stronsiyum İçeren Hidroksiapatit (HA10Sr) Materyalin Elementel İçeriği Ve EDS Görüntü Desenleri	32
Şekil 4.5. %15 Stronsiyum İçeren Hidroksiapatit (HA15Sr) Materyalin Elementel İçeriği Ve EDS Görüntü Desenleri	33
Şekil 4.6. Hidroksiapatit Ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin (HA5Sr, HA10Sr, HA15Sr) X-Işını Kırınım (XRD) Desenleri	35
Şekil 4.7. Kütlece %7,5 Zoledronik Asit İçeren Hidroksiapatit (HA7,5ZA) Materyalin Elementel İçeriği Ve EDS Görüntü Desenleri	37
Şekil 4.8. Saf Hidroksiapatit (HA), Zoledronik Asit (ZA), %5 ve %7,5 Zoledronik Asitle Modifiye Edilmiş Saf Hidroksiapatit Nanopartiküllerin (HA5ZA, HA7,5ZA) X-Işını Kırınım (XRD) Desenleri	38
Şekil 4.9. A) CMC/OD Hidrojel B) CMC/OD/HA Hidrojelinin Enjekte Edilebilirliği C) Enjekte Edilmiş CMC/OD Hidrojel D) Renkli CMC/OD Hidrojellerinin Ayrı Görüntüsü E) Yeniden Birleştirilmiş CMC/OD Hidrojellerinin Görüntüsü F) Kendini İyileştiren CMC/OD Hidrojellerinin Görüntüsü	39
Şekil 4.10. Dekstan (Dex), Oksitlenmiş Dekstran (O-Dex), Kitosan (CH), Karboksimetil Kitosan (CMC) ve Karboksimetil Kitosan / Oksitlenmiş Dekstran (CMC/OD) Hidrojele Ait FTIR Spektrumu	40
Şekil 4.11. CMC/OD Hidrojelinin 100x ve Hidroksiapatit Nanopartikül İçeren CMC/OD/HA Hidrojelinin 250x Büyütmedeki SEM Görüntüleri	42

Şekil 4.12. A) CMC/OD Hidrojel ve CMC/OD/HA Hidrojelinin Karşılaştırmalı G' Değerleri B) CMC/OD Hidrojeli ve CMC/OD/HA Hidrojelinin Karşılaştırmalı G'' Değerleri C) Kendi Kendini İyileştiren CMC/OD Hidrojelinin Karşılaştırmalı G' ve G'' Değerleri	43
Şekil 4.13. CMC/OD Hidrojel ve CMC/OD/HA Hidrojelinin Degredasyon Grafiği	44
Şekil 4.14. CMC/HA Hidrojellerinden Elde Edilen Ekstraktlarla 24 Saat Uyarıldıktan Sonra Hücrelerdeki MTT Sonuçları	45
Şekil 4.15. CMC/HA Hidrojellerinden Elde Edilen Ekstraktlarla 24 Saat Uyarıldıktan Sonra Hücrelerde LDH Sonuçları	46
Şekil 4.16. 1, 4 ve 7 Günlük EtBr/Calcein AM Floresansı	48
Şekil 4.17. 1, 4 ve 7 Gün Boyunca Çeşitli Stronsiyum ve Zoledronik Asit Yüklü CMC/OD Hidrojel Formülasyonlarındaki Hücrelerdeki ALP Aktivitesi	49
Şekil 4.18. 1, 4 ve 7 Gün Boyunca Çeşitli Stronsiyum ve Zoledronik Asit Yüklü CMC/OD Hidrojel Formülasyonlarındaki Hücrelerdeki Ca ²⁺ Birikimi	51
Şekil 4.19. Stronsiyum ve Zoledronik Asit Yüklü CMC/OD Hidrojellerinin Çeşitli Formülasyonlarının <i>E. Coli</i> (A) ve <i>S. Aureus</i> 'a (B) Karşı Antibakteriyel Aktivitesi	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
Mw	Molekül Ağırlığı
V	Volt
A	Amper
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
N	Normal
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
θ	Teta
°	Derece

Kısaltmalar

HA	Hidroksiapatit
Sr	Stronsiyum
Ca	Kalsiyum
P	Fosfor
C	Karbon
HASr	Stronsiyum İçeren Hidroksiapatit
HAZA	Zoledronik Asit İle Modifiye Edilmiş Hidroksiapatit
HASrZA	Zoledronik Asit İle Modifiye Edilmiş Stronsiyum Hidroksiapatit
TCP	Trikalsiyum fosfat
Da	Dalton
CS	Kitosan
CMC	o-Karboksimetil Kitosan
Dex	Dekstran
O-Dex	Oksitlenmiş Dekstran
CMC/OD	Karboksimetil Kitosan / Oksitlenmiş Dekstran Hidrojel
CMC/OD/HA	Hidroksiapatit İçeren Kompozit Hidrojel
ALP	Alkalen Fosfataz
ECM	Ekstraselüler Matris

1.GİRİŞ

Çalışma kapsamında travmatik kemik hasarlarının tedavisine yönelik olarak, hidroksiapatitin farklı oranlarda stronsiyum ile işlevselleştirilmesi, devamında farklı oranlarda zoledronik asit ile modifiye edilerek, sentezlenen kompozit nanopartikülleri içeren enjekte edilebilir hidrojel yapılarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Travmatik kemik hasarlarının tedavisinde kemik inorganik fazının ana bileşeni olan hidroksiapatit, osteokondüktif ve biyouyumlu yapısı nedeniyle kemik doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidroksiapatitin kristal yapı, kristal büyüklüğü, gözenek hacmi gibi özelliklerini istenilen kriterlere taşıyabilmek amacıyla, stronsiyum, magnezyum, bor gibi elementlerle fonksiyonelleştirildiği çalışmalar mevcuttur. Hidroksiapatitin kemik rezorpsiyonunu azaltıcı etkiye sahip bisfosfonat yapılarla kullanıldığı çalışmalar ise çok sınırlıdır. Stronsiyum ile işlevselleştirilmiş, zoledronik asit ile modifiye edilmiş hidroksiapatit nanopartikül içeren enjekte edilebilir hidrojel yapılar geliştirme fikri ise bu çalışmaya özgüdür ve çalışmanın birincil amacını oluşturmaktadır.

Tez çalışması kapsamında:

- 1- Saf hidroksiapatit (HA) ve stronsiyum destekli hidroksiapatit (SrHA) nanopartikül yapılarını sentezlemek ve karakterize etmek,
- 2- Geliştirilen stronsiyum destekli hidroksiapatit (SrHA) ve saf hidroksiapatit (HA) nanopartikülleri 3. nesil bisfosfonat olan zoledronik asit ile modifiye etmek ve karakterize etmek,
- 3- Sentezlenen stronsiyum destekli zoledronik asit modifiye hidroksiapatit nanopartikülleri içeren enjekte edilebilir karboksimetil kitosan/oksitlenmiş dekstran hidrojeller geliştirmek. Geliştirilen tüm hidrojel yapılarını fizikokimyasal açıdan karakterize etmek,
- 4- Geliştirilen stronsiyum destekli zoledronik asit modifiye hidroksiapatit nanopartikül içeren hidrojellerin *in vitro* özelliklerini incelemek amacıyla hücre kültür çalışmaları yapmak,

5- Geliştirilen stronsiyum destekli zoledronik asit modifiye hidroksiapatit nanopartikül içeren hidrojellerin kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanım potansiyelini incelemek hedeflenmektedir.

Özetlenen hedefler doğrultusunda, travmatik kemik hasarlarının tedavisine yönelik, hasarlı dokunun iyileşmesini destekleyici ve teşvik edici özellikte, yüksek biyouyumlu özellik gösteren bir biyomateriyal üretimi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Kemik dokusu iskelet sistemindeki ana elemanlardan biridir. Aynı anda yüksek güç ve sertlik gösteren eşsiz bir materyaldir. Söz konusu eşsiz özellikler organik yapıdaki proteinler ve inorganik yapıdaki mineral kristallerini içeren kompozit bir materyale dayanmaktadır. Sağlıklı kemik tüm fizyolojik ve anatomik işlevlerini yerine getirebilecek şekilde yenilenme özelliğine sahip olan dinamik bir materyaldir[1]. Kemik dokusu, inorganik kökenli ve organik kökenli iki ayrı fazdan oluşmaktadır. Çoğunlukla kolajenden oluşan organik faz kemik kütlelerinin yaklaşık %35'ini oluşturmaktadır. Kemiğin mineral fazı genel itibariyle hidroksiapatit formundaki kristal yapıda kalsiyum ve fosfattan oluşmaktadır. Kemik yapısında osteoblast, osteosit ve osteoklast olmak üzere üç ayrı tür hücre bulunmaktadır. Osteoblast hücreler kemik ekstraselüler matrisinin, organik ve inorganik içeriklerini üretmektedir. Bu hücreler ayrıca tip I kollajen, alkalin fosfataz (ALP) gibi kemik oluşumunun belirteci olan protein ve enzimleri sentezlemektedir. Kemiğin yapısı ve mekanik davranışı, bu fazların miktarı, mekanik bütünlüğü, fazların yapısal organizasyonu ve aralarındaki fiziksel etkileşim tarafından belirlenmektedir. Kemik dokusu mineralizasyonunun derecesi yük taşıma söz konusu olduğunda önem arz etmektedir[2].

2.2. Kemik Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, mevcut tedavi yöntemleriyle ilgili komplikasyonları azaltma potansiyeline sahip çözümleri araştıran bir bilim dalıdır. Doku mühendisliği, işlevini kaybetmiş dokuyu iyileştiren materyaller geliştirme amacıyla mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilkelerini uygulayan bir bilim dalı olarak ifade edilebilir[3]. Bu kavram dokunun işlevlerini geliştirmek

için hücre ikamelerini ve dokuyu indükleyen materyalleri kullanmaktadır[4].

Kemik doku mühendisliğinde kullanım amacıyla tasarlanan ideal bir iskele, hücre büyümesine ve doku gelişimine olanak sağlayan bir matristir. Söz konusu iskele kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak doğal ekstraselüler matrisin (ECM) yapısını taklit edebilmelidir. Kemik doku mühendisliği kemik defektlerinin onarımı esnasında hücrelerin kendi ECM matrislerini sentezlemeleri için geçici bir ortam oluşturan, biyolojik olarak bozunabilir biyomateryaller üretmek amacıyla ortaya çıkmıştır[5]. Kemik doku mühendisliği biyomateryaller ve hücrelerin bir kombinasyonunu kullanarak yeni kemik oluşumunu amaçlamaktadır. Bu nedenle kemik dokusunun kimyasal ve fizyolojik yapısını taklit edebilen biyomalzemeler doku mühendisliğinde önemli yer tutmaktadır. Geniş bir morfolojik çeşitlilikte tasarlanabilen doku destek materyalleri kemik doku mühendisliği yaklaşımında önemli bir yere sahiptir. Tasarım ve üretim aşamalarında kullanılan yöntemlerin çeşitliliği kemik doku mühendisliği yaklaşımındaki çalışmalara rehberlik etmektedir[6]. Bir dokunun ekstraselüler matriksini taklit ederek doku oluşumunu destekleyen yapılara biyomalzeme adı verilmektedir[7]. Hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasına uygun bir doku destek malzemesi, uygun yüzey özellikleri, yüksek gözeneklilik gibi gereksinimleri yerine getirmelidir. Ek olarak uygun mekanik özelliklere sahip olmalı ve toksik olmamalıdır. Bu nedenle, biyomalzemenin üretiminde seçilecek olan malzeme kemik doku mühendisliği uygulamalarında kritik bir öneme sahiptir[8].

2.3. Kalsiyum Fosfat Bileşikleri

Kalsiyum fosfat bileşikleri $H_2PO_4^-$, $H_2PO_4^{2-}$ veya PO_4^{3-} iyonları içeren tuzlar olarak tanımlanabilir. Kemiğin inorganik fazında $H_2PO_4^-$ ve PO_4^{3-} iyonlarının doğal olarak bulunması nedeniyle kalsiyum fosfat bazlı greft malzemeleri ortopedik uygulamalarda mükemmel biyolojik aktivite göstermektedir[8]. Kemiğin ana bileşenleri olan kalsiyum fosfatlar, yüksek miktarda kalsiyum ve fosfat, eser miktarda magnezyum, karbonat, hidroksil, klorür ve florür iyonları içermektedir. Kalsiyum fosfatlar, gözenekli yapıları sayesinde kan ve vücut sıvılarının kemiğe nüfuz etmesine izin vermekte ve doku ile malzeme arasındaki etkileşimi arttırmaktadır[9]. Biyomühendislik uygulamalarında yaygın kullanılan kalsiyum fosfat bileşikleri hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfattır[10]. Kalsiyum fosfat seramiklerin kimyasal özellikleri üretim süreçlerinden yüksek oranda etkilenmektedir[11]. Kalsiyum fosfatların osteoindüktif özellikleri hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklemektedir. Bu özellikler

kemik rejenerasyonu için önem arz eden parametrelerdir[12]. Bir biyomalzemenin sahip olduğu yüzeyin pürüzlülüğü, malzemenin çeşitli ortamlardaki çözünürlüğü, malzemenin kristal yapısı gibi özellikler hücre tutunmasını etkileyen faktörler arasında yer almaktadır[10]. Kalsiyum fosfat seramikler 950-1300 °C sıcaklık aralığında sinterlenerek yapıya mukavemet kazandırılmaktadır. Genel itibariyle sinterleme işlemi malzemenin homojenliğini arttırmaktadır[13].

2.4. Hidroksiapatit

Apatitler en popüler kristalin biyolojik kalsiyum fosfatlardır ve memelilerin kemik ve diş gibi tüm mineralize dokularında bulunmaktadır. Apatitlerin kimyasal bileşimi $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$ formülü ile tanımlanmaktadır. Me, Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} gibi iki değerlikli bir metalik iyonu temsil etmektedir. XO_4 , PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} gibi üç değerlikli bir anyondur. Y ise OH^- , F^- , Cl^- , Br^- gibi tek değerlikli bir anyonu ifade etmektedir[14]. Hidroksiapatitin doğal dokularla sıkı bağlar oluşturma yeteneği, doğal kemikte bulunan minerallere benzer yapısına atfedilmektedir. Nanopartikül boyutuna sahip olan hidroksiapatitin gelişmiş sito-uyumluluğa sahip olduğu gösterilmiştir[15] [16] [17] [18]. K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} , F^- ve Sr^{2+} gibi iyonik ikameler kemik oluşumunda ve kemik dokusundaki hidroksiapatitin normal işlevinde önemli bir rol oynamaktadır[19]. İnsan vücudunda bulunan bir eser element olan stronsiyum, kemik oluşumunu destekleyici özellik göstermektedir. Buna ek olarak osteoklast fonksiyonunu engelleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Bazı çalışmalar kemik defektlerinin stronsiyum içeren hidroksiapatit (SrHA) materyalleriyle onarıldığını ve stronsiyumun osteojenik farklılaşmadaki rolünü bildirmektedir [20] [21] [22].

2.4.1. Hidroksiapatit Sentez Yöntemleri

Hidroksiapatit çeşitli yöntemler kullanılarak sentezlenebilmektedir. Kuru yöntemler, ıslak yöntemler ve yüksek sıcaklık yöntemleri bu yöntemlere örnek olarak verilebilir[23]. Kullanılan her yöntem farklı kristal boyut ve morfoloji ile sonuçlanmaktadır. Kristal boyut ve morfoloji gibi hidroksiapatitin yapısal özellikleri, mekanik ve biyolojik özellikleri önemli ölçüde etkilemektedir. Aynı zamanda bu yapısal özellikler hidroksiapatitin biyomedikal uygulamasını belirlemektedir. Bu bağlamda hidroksiapatitin morfolojisini, kristalliğini, boyutunu ve kimyasal bileşimini kontrol edebilen bir sentez yöntemi geliştirmek biyomühendislik uygulamalarında bir zorunluluk haline gelmiştir[24].

2.4.1.1. Kuru Yöntem

Kuru yönteme dayalı hidroksiapatit sentezi katı hal ve mekanokimyasal yöntemleri içermektedir. Kuru yöntem kullanılarak hidroksiapatit sentezinde kuru formdaki kalsiyum ve fosfat içeriğine sahip kimyasallar karıştırılmaktadır. Kuru yöntemler hassas ve kontrollü koşullar gerektirmemesi nedeniyle tozların seri üretimi için uygun sentez yöntemleridir[23].

Katı Hal Yöntemi

Katı hal reaksiyonu ile hidroksiapatit yönteminde, karışık bir katı reaktantın ısıtılarak ayrışma prensibine dayalı olarak sentez yapılmaktadır. Katı hal reaksiyonu ile hidroksiapatit sentezinde kalsiyum ve fosfat içeren kimyasal grupların kalsinasyonuna dayalı olarak sentez yapılmaktadır. Katı hal hidroksiapatit sentezinin mekanizması kalsiyum ve fosfattan iyonun katı difüzyonunu ve sonrasında reaksiyonu başlatmak için yüksek sıcaklığın uygulandığı bir prosestir[24]. Katı hal tekniği ile kalsiyum oksit (CaO) ve pirofosfat (P_2O_5) öncüllerinin hekzagonal hidroksiapatit yapısını oluşturduğu bildirilmiştir. X-ışını kırınım (XRD) deseni sentezlenen hidroksiapatit numunenin piklerinin monetit (CaPO_3OH) ve kalsiyum eksikliği olan hidroksiapatit ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$) yapıları ile eşleştiğini doğrulamaktadır. Tüm bu bilgiler ışığında, katı hal yöntemi kullanılarak yapılan sentezlerde birçok kalsiyum fosfat fazının varlığının görülebileceği sonucu çıkarılmaktadır[23].

Mekanokimyasal Yöntem

Mekanokimyasal yöntem, öğütme yoluyla sıkıştırma, kesme veya sürtünmeyi kullanarak kimyasal dönüşüm başlatan bir teknik olarak tanımlanabilir[25]. Mekanokimyasal teknikler söz konusu kimyasal dönüşümü başlatmak için genellikle belirli frekanslarda bilyalı öğütme sistemleri kullanılmaktadır. Mekanokimyasal reaksiyon sırasında oluşan sıkıştırma kuvveti ve ortamın sıcaklığındaki yükselme kimyasal reaksiyona katkıda bulunarak difüzyon sürecini iyileştirmektedir[26].

2.4.1.2. Islak Yöntem

Islak yönteme dayalı hidroksiapatit sentezi sulu    zelti kullanımına dayanmaktadır. Islak yöntemler kullanılarak sentezlenen hidroksiapatit materyalin morfolojisi ve ortalama boyutu kontrol edilebilmektedir. Bu avantaja rağmen, sentezlenen hidroksiapatitin d    k kristallige sahip olması gibi bir dezavantaj da mevcuttur[23].

Kimyasal    kt rme

Kimyasal    kt rme d    k maliyete sahip olması nedeniyle hidroksiapatit sentezindeki en yaygın yöntemlerden biridir[27]. Kimyasal    keltme yöntemi Ca^{2+} kaynağı olarak kalsiyum nitrat, PO_4^{3-} kaynağı olarak diamonyum hidrojen fosfat gibi kalsiyum ve fosfat içeren reaktiflerin hidroksiapatit molar oranına göre (1,67) hazırlanarak karıştırıldığı bir yöntemdir. Son olarak bu karışım genellikle alkali pH'a ayarlanarak süzülür, yıkanır ve kurutularak toz haline getirilir[23]. Hidroksiapatit sentezinde kimyasal    kt rme yöntemi kullanmadan önce birkaç önemli işlem parametresinin yapılması gerekmektedir. Kullanılan kalsiyum ve fosfat öncül kaynaklar hidroksiapatitin 1,67 olan molar oranına göre ayarlanmalıdır. Ca/P 1,67 molar oranının dışındaki oranlar hidroksiapatit dışında ayrı bir kalsiyum fosfat fazının oluşmasına yol açabilir. Karışım pH'ı hidroksiapatit üretiminde önemli bir parametredir. Hidroksiapatit sentezindeki optimum pH'ı inceleyen bir çalışma, pH'taki azalma ile birlikte hidroksiapatit    ktisindeki kalsiyum miktarının da azaldığını ortaya koymuştur[27].

Hidrotermal Yöntem

Hidrotermal yöntem ile hidroksiapatit sentezi yüksek sıcaklık ve sulu ortama dayanmaktadır[28]. Hidroksiapatit sentezlemek için kullanılan hidrotermal yöntem, yüksek sıcaklık ve basınç ile kalsiyum ve fosfat öncülleri içeren    zeltideki reaksiyonu uyarmaktadır. Reaksiyon  artları yüksek sıcaklık ve basın a dayanmaktadır. Basınç ve sıcaklık kimyasal reaktiviteyi artırarak nispeten sabit stokiyometrik orana sahip olan ve yüksek kristal yapıda hidroksiapatit üretimine imkan tanımaktadır[29]. Geleneksel hidrotermal hidroksiapatit sentezinde üretilen hidroksiapatitin birbiri ile uyumsuz şekillere sahip olması önemli bir dezavantajdır. Bu dezavantajı açmak için hidroksiapatit morfolojisinin çeşitli yüzey aktif madde veya şelatlama ajanı ile kontrol edildiği çalışmalar literatürde mevcuttur[30]. Hidrotermal yöntem daha yüksek kristal yapıda hidroksiapatit üretimine imkan sağlayan bir tekniktir. Yöntemin  st nl ğ  çeşitli modifiye edici ajanlara dayanmaktadır.

Hidroliz Yöntemi

Hidroliz yönteminde su iyonizasyonu kullanılarak hidrojen ve hidroksit iyonlarının difüzyon şartları sağlanmaktadır. Kalsiyum fosfat bileşiklerinin hidrolizi stokiometrik açıdan tutarsız hidroksiapatit oluşumuyla sonuçlanabilir[31]. α -TCP'nin hidroksiapatite hidrolizi için su ve organik çözücüler kullanıldığı bir çalışmada, hidroksiapatit faz dönüşümünün 24 saat sürdüğü bildirilmiştir[32]. Hidroliz yöntemi ile kalsiyum ve fosfat öncülleri yüksek saflıkta hidroksiapatite dönüşmüş olsa da bu dönüşüm için uzun işlem süreçlerinin gereksinimi nedeniyle hidroliz yöntemi ıslak yöntemler arasında en az kullanılan yöntem olarak kabul edilmektedir.

2.4.1.3. Yüksek Sıcaklık Yöntemi

Yüksek sıcaklık yöntemi, temel olarak hidroksiapatit malzemeleri ayrıştırma aşamasında yüksek sıcaklıkların kullanıldığı yanma ve piroliz yöntemlerinden oluşmaktadır. İkincil fazların oluşma ihtimalinin yüksek olması nedeniyle hidroksiapatit sentezinde yanma ve piroliz yöntemleri düşük kullanım alanına sahiptir[23].

Yanma

Oksidan ve organik yakıt arasında hızlı bir şekilde, ekzotermik redoks reaksiyonlarının olduğu bir tekniktir. Karışım düşük bir sıcaklıkta ısıtıldıktan sonra ani bir sıcaklık artışına tabi tutulur. Ardından hızlı soğutma ile partikül büyümesi önlenerek çekirdeklenme başlatılır. Yöntemde yüksek kristalli hidroksiapatit üretimi mümkündür ancak faz safsızlıkları söz konusudur[23].

Piroliz

Piroliz yakma yönteminden farklı olarak reaktanlarla karıştırma gereksinimi olmadan malzemenin elektrikli fırının sıcak bölgesine püskürtüldüğü bir tekniktir. Sentez genellikle kümelenmiş formda toz ile sonuçlanmaktadır[29].

2.4.2. Hidroksiapatitin Kullanım Alanları

Kemik yaralanmalarının tedavisinde en etkili ve başarılı osteoindüktif materyaller greftler ve hidroksiapatit gibi kalsiyum fosfat seramik materyallerdir. Ancak, allotransplantlar ve ksenograftlar yüksek maliyet, sınırlı bulunabilirlik, kişiselleştirilmiş ürünlerin geliştirilmesi zorluğu ve hastalık bulaşma riski gibi dezavantajlara sahiptir. Kemiğin inorganik fazında $H_2PO_4^-$ ve PO_4^{3-} iyonlarının doğal olarak bulunması nedeniyle, kalsiyum fosfat bazlı greft materyalleri ortopedik uygulamalarda mükemmel biyolojik aktivite göstermektedir. Kalsiyum fosfatlar, kan ve vücut sıvılarının kemiğe nüfuz etmesine izin veren gözenekli bir yapıya sahiptir. Bu özellik materyalin çözünme hızını artırmakta ve doku-materyal etkileşimini güçlendirmektedir[33] [34].

Hidroksiapatit kemik doku mühendisliği biyomateriyali olarak çeşitli biyomühendislik uygulamalarında kullanım alanına sahiptir[35] [36]. Kemik matrisinin inorganik bileşenine gösterdiği kimyasal benzerlik nedeniyle sentetik hidroksiapatit ile sert dokular arasında güçlü bir afinite bulunmaktadır. İki materyal arasında gerçekleşen güçlü kimyasal tutunma klinik uygulamalarda büyük üstünlüklere sahiptir[37]. Sentetik hidroksiapatitin yüksek biyouyumluluk, yavaş biyodegradasyon özelliği ve osteokondüktif-osteoindüktif yetenekleri gibi birçok avantajı mevcuttur[38]. Sentetik hidroksiapatit özellikle sert doku onarımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın kullanım alanları arasında hasarlı kemik dokusunun onarımı, kemik rejenerasyonu ve kemik veya diş dokularında dolgu maddesi yer almaktadır[39]. Ancak hidroksiapatit materyallerin düşük mekanik mukavemeti, kullanım alanını sınırlayan önemli bir parametredir. Nanokristal yapıdaki hidroksiapatit tozlarının kullanımı, geniş yüzey alanları sayesinde kırılma tokluğunu ve diğer mekanik özellikleri iyileştirmektedir. Nano boyuttaki hidroksiapatit, mikro boyut yapılara göre yüksek biyoaktivite göstermektedir[40]. Bu nedenle doku implantlarındaki kullanımlarda nanopartikül yapısındaki hidroksiapatit, diğer implantlara kıyasla daha iyi biyouyumluluk sergilemektedir. Sentezlenen hidroksiapatit kırılman olmasi nedeniyle yük taşıyan kemik replasmanlarında tek başına kullanım alanına sahip değildir, sert ve yumuşak fazlardan oluşan implant malzemeleri ile kompozit malzemeler olarak kullanılmaktadır[41].

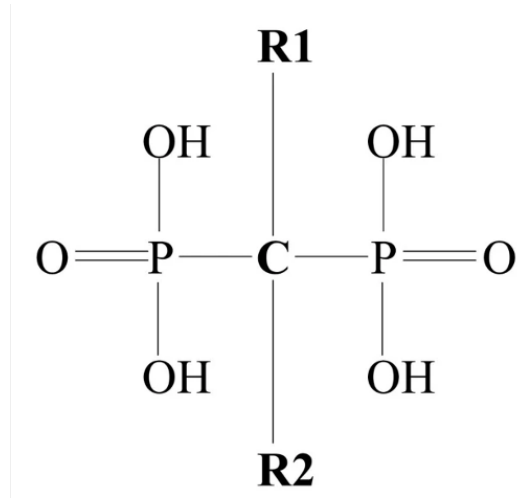
Hidroksiapatit seramikler yüksek biyouyumluluk ve osteokondüktiviteleri nedeniyle yapay kemik ikamesi olarak popüler bir kullanım alanına sahiptir. Hidroksiapatit seramiklerinin gözenekli yapıları klinik uygulamalarda yoğun ilgi görmektedir. Hidroksiapatitin osteokondüksiyonunu etkileyen faktörler arasında gözenek yoğunluğu ve bağlantıların boyutu

yer almaktadır. Gözenek boyutu ve şekli, gözenekler arası bağlantı gibi özellikler doku rejenerasyonundaki önemli faktörler olarak kabul edilmektedir[42].

2.5. Bisfosfonatlar

Osteoporoz kırık ihtimalini arttıran bir kemik hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Kemik dokusu kaybı, bozuk kemik mimarisi ve kemik kırılabilirliği ile ilişkilidir[43]. Osteoporoz sonucu oluşan kemik kaybı kırıklar oluşana kadar herhangi bir semptom göstermemektedir. Postmenopozal östrojen eksikliğinin osteoporozun en yaygın nedeni olduğu rapor edilmiştir. Düşük östrojen ile birlikte artan osteoklast aktivitesi trabeküler bağlantıyı bozarak poroziteyi artırmaktadır. Azalan kemik yoğunluğunun bir sonucu olarak kemiğin mekanik dayanımı azalır ve aşırı mekanik yüklenme durumlarında kırık oluşur[44] [45]. Amerika Birleşik Devletleri'nde 10 milyon kişiye osteoporoz tanısı konmuştur. 33 milyon kişinin ise düşük kemik kitlesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Düşük kemik kitlesi osteopeni olarak tanımlanmaktadır ve osteopeni aşamasında kırık riski daha yüksektir. Her yıl meydana gelen 2 milyonun üzerinde kırık vakası osteoporoz kökenlidir. Beyaz kadınların menopoz sonrası dönemlerinde en az bir osteoporotik kırığa maruz kalma riskinin %40 olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir[43]. Osteoporotik kökenli kalça kırıklarının mortalite ve morbidite ile yüksek oranda ilişkilendirildiği araştırmalar bulunmaktadır. İlgili araştırmalarda osteoporotik kökenli kırıklara sahip olan hastaların %50'sinde kalıcı hareket bozuklukları görüldüğü belirtilmiştir. Ek olarak osteoporotik kökenli kırıklara sahip hastaların %25'inin bağımsız yaşam için gerekli becerileri kaybettiği ilgili çalışmada rapor edilmiştir[46].

Bisfosfonatlar (BF) osteoporoz, kemik tümörü ve metastazı gibi hastalıkların neden olduğu kemik rezorpsiyonunun önlenmesi ve tedavisinde kullanılan farmakolojik ajanlardır[47]. Bisfosfonatlar kemik rezorpsiyonunu inhibe ederek potansiyel kırıkları azaltma ve önleme özelliğine sahiptirler[48] [49]. Moleküler yapı itibarıyla çeşitli fizyolojik reaksiyonların yan ürünü olan pirofosfat (P-O-P) yapısına benzemektedir. Pirofosfat grubundaki oksijen atomunun karbon atomu ile yer değiştirmesi sonucu oluşmaktadırlar. Bisfosfonatlar R1 ve R2 olarak adlandırılan iki yan zincire bağlı C atomunu içermektedir. R1 grubu genellikle hidroksil grubundan oluşurken, R2 grubu bisfosfonat yapısına özgü spesifik gruplar içermektedir[50] Bisfosfonatların kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir.



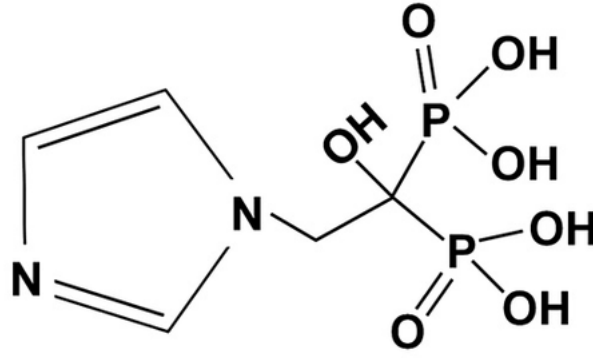
Şekil 2.1. Bisfosfonatların kimyasal yapısı[51]

R1 yan zinciri kemiğe bağlanma afinitesini, R2 yan zinciri ise rezorpsiyon önleyici aktiviteyi belirlemektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanımı onaylanan bisfosfonatlar (alendronik asit, ibandronik asit, risedronik asit ve zoledronik asit), rezorpsiyon önleyici özelliktedir ve azot içeren R2 yan zincirlerinden oluşmaktadır. Yan zincirlerin kimyasal yapısındaki meydana gelecek değişiklikler, bisfosfonatın kemiğe afinite gücünü, dağılım özelliğini ve tedavi sonrası kemik yapısında kalma süresini belirlemektedir[52].

Bisfosfonatların yapısında bulunan fosfat grupları arasındaki karbon yapıyı kimyasal maddelere ve enzimlere karşı kararlı hale getirmektedir. Kararlı yapısı nedeniyle bisfosfonatlar fizyolojik ortamlarda metabolitlere dönüştürülemez ve herhangi bir değişikliğe uğramadan atılır[53] [54]. Düşük bisfosfonat konsantrasyonlarının osteoblast proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırarak osteoblastik fonksiyon üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir[55] [56].

2.6. Zoledronik Asit

Zoledronik asit, (1-hidroksi-2-imidazol-1-il-1-fosfonoetil)fosfonik asit, moleküler yapısı $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}_2$ olan üçüncü nesil bir bisfosfonattır ve 2001 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan bir osteoporoz ilacıdır. Zoledronik asitin aminobisfosfonat grubuna dahil olmasının nedeni yapısında bulunan azot içeriğidir. Hidroksiapatit ile yüksek afiniteye sahip olduğu bilinmektedir[57]. Zoledronik asitin kimyasal yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir.

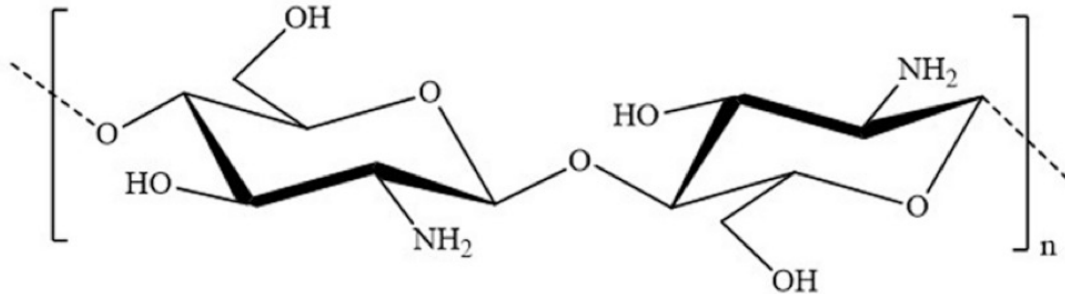


Şekil 2.2. Zoledronik asitin kimyasal yapısı[57].

Zoledronik asit modifiye edilmiş hidroksiapatit materyalinin osteoblast benzeri MG-63 hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir[57]. Zoledronik asit ve stronsiyumun eş zamanlı varlığında, stronsiyum osteoblast çoğalması ve farklılaşması üzerinde zoledronik asitten daha etkilidir. Zoledronik asidin ise osteoklast aktivitesi üzerinde daha yüksek bir inhibitör etkisi vardır [58] [59].

2.7. Kitosan

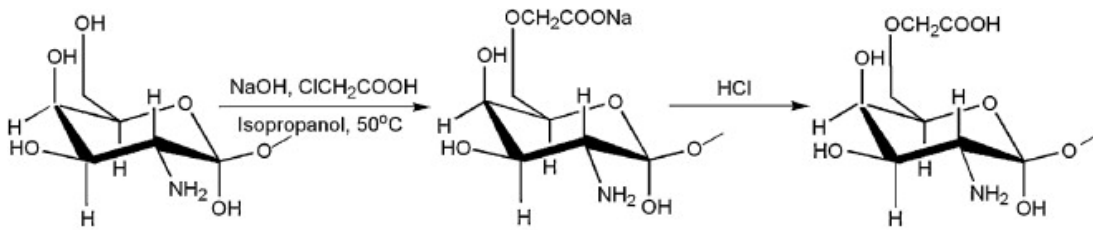
Kitosan (CS), çoğunlukla kabukluların sert dokularından elde edilen kitinin bir formudur[60]. Kitosanın moleküler ağırlığı deasetilasyon derecesine ile değişmektedir. Deasetilasyon yüzdesi azaldıkça moleküler ağırlık artmaktadır. Yüksek moleküler ağırlık yüksek kimyasal kararlılık ve mekanik mukavemet sağlamasının yanında çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğü azaltmaktadır[61]. Kitosanın kimyasal yapısı Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Kitosanın kimyasal yapısı[62]

2.7.1. Kitosanın Karboksimetilasyonu

Kitosan sert kristal yapısı nedeniyle suda düşük bir çözünürlüğe sahiptir. Bu da çeşitli uygulamalardaki kullanımın alanını sınırlamaktadır. Suda çözünen kitosan türevlerinin hazırlanmasıyla bu dezavantaj giderilebilmektedir[63]. Yapısında hidroksil ve amino grupları gibi fonksiyonel gruplar kitosanı kimyasal modifikasyonlara son derece uyumlu hale getirmektedir[64]. Hidrofobik bir modifikasyon olan karboksimetilasyon ile karboksimetil kitosan (CMC) elde edilmektedir[65] [66]. Kitosanın karboksimetilasyon reaksiyonu ve karboksimetil kitosan (CMC) bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 2.4'te verilmiştir.



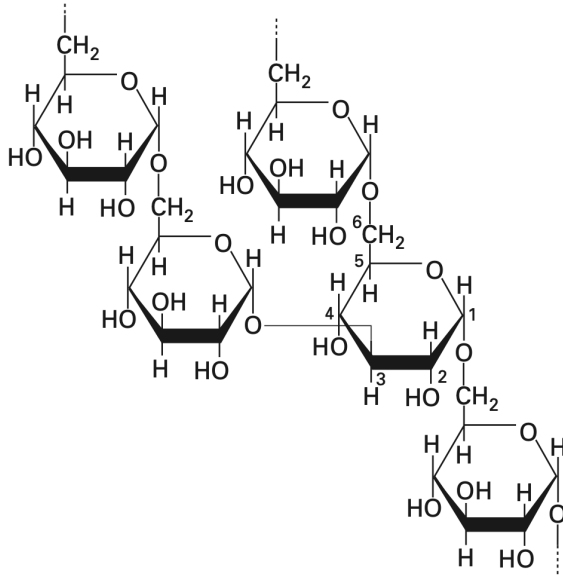
Şekil 2.4. Kitosanın karboksimetilasyonu[66]

2.7.2. Kitosanın Biyomühendislikteki Uygulamaları

Biyouyumluluk, anti-bakteriyel ve anti-fungal özellikler, bol miktarda bulunması, biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama gibi üstün özellikleri nedeniyle biyomalzemeler arasında belirgin bir konuma sahiptir[67]. Glikozidik bağların varlığı sayesinde kitosan mükemmel elastikiyet özellikleri kazanmaktadır. Ek olarak modifiye reaksiyonları daha düşük bir inflamatuvar etkiyle sonuçlanmaktadır[68]. Kitosan fizyolojik ortamda degrades olduğunda zararsız amino şekerlere dönüşmektedir. Tüm bu gelişmiş özellikleri nedeniyle kitosan doku mühendisliği uygulamalarında geniş bir kullanım alanına sahiptir[69] [70] [71]. Kitosan doku mühendisliği uygulamalarında hücrelerle iletişim kuran ve yeni doku büyümesini yönlendiren sentetik bir hücre dışı matris görevi görmektedir. Bu kullanım türü kitosanın bozunma hızının yeni doku oluşum hızı ile uyum içerisinde olmasını gerektirmektedir. Ancak fizyolojik pH'taki düşük çözünürlüğünden dolayı bozunma hızı çok yavaştır. Kitosanın bu önemli dezavantajı karboksimetilasyonla giderilmektedir[72].

2.8. Dekstran

Dekstran, -1,6-bağlı D-glukopiranoz kalıntılarından ve -1,2, -1,3 veya -1,4-bağlı yan zincirlerden oluşan bakteriyel kökenli bir polisakkarittir[73]. Dekstranın kimyasal yapısı şekil 2.5'te verilmiştir.



şekil 2.5. Dekstranın genel yapısı[73]

Bakteriyel kökenine göre farklı kimyasal bileşime sahip dekstran *Leuconostoc Mesenteroides*, *Leuconostoc Dextransicum* ve *Streptobacterium Dextransicum* gibi çok sayıda bakteri tarafından sentezlenmektedir. Dekstran kaynağına bağlı olarak farklı dallanma derecesi, moleküler ağırlık, gibi farklı yapı ve özelliklere sahiptir. Mikrobiyolojik sentez ürünü doğal dekstran olarak kabul edilmektedir. Doğal dekstran yapı itibariyle yüksek oranda disperse edilebilen bir materyaldir. Dekstran, hafif asidik ve bazik koşullar altında oldukça suda çözünmektedir. Dekstran hidroksilik grup içeriği nedeniyle kimyasal ve fiziksel modifikasyon işlemlerine yüksek yatkınlık göstermektedir[74].

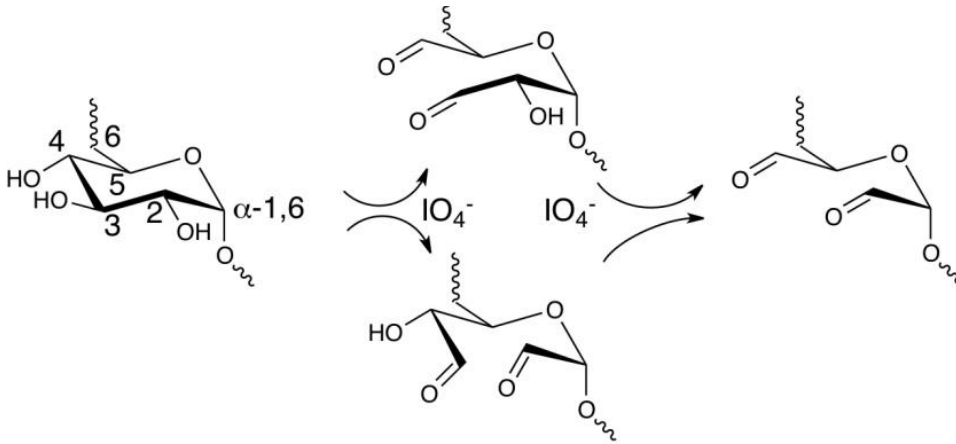
2.8.1. Dekstranın Biyomühendislikteki Uygulamaları

Dekstranın farmakolojik uygulamalarda makromoleküler taşıyıcı olarak kullanılmasını sağlayan unsur kimyasal özellikleridir. Dekstran, diğer polisakkaritlere kıyasla insan enzimleri tarafından uzun sürede parçalandığı ve gastrointestinal sistemde mikrobiyal dekstranazlar tarafından parçalandığı için birçok biyomedikal uygulamada yaygın kullanım alanına sahiptir.

İlaç ve proteinlerin taşınmasında makromoleküler taşıyıcı olarak yaygın kullanım alanına sahiptir. Ek olarak ilaçların yan etkilerin azaltılması, terapötik ajanların stabilize edilmesi, ilaç hedeflemesi, ilaçların çözünürlüklerinin artırılması, salım özelliklerinin optimize edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Proteinlerin immünogenitesini azaltmak amacıyla dekstranın kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Molekül ağırlığı 40 kDa'dan düşük olan moleküller böbrek temizliği yoluyla elimine edilebilir ve 8 saatlik bir yarı ömre sahipken, molekül ağırlığı 40 kDa'dan yüksek olan moleküller daha uzun yarı ömre sahiptir. Klinik uygulamalarda kullanılan dekstranlar, asit hidrolizi yoluyla kısmi depolimerizasyon yöntemi kullanılarak yüksek moleküler ağırlıklı doğal dekstranlardan elde edilmektedir[74] [75].

2.8.2. Dekstran Oksidasyonu

Periyodat iyonu ile dekstran oksidasyonu, basit bir diyaliz adımı ve ardından dondurarak kurutma ile saflaştırılmış bir ürün veren katalizsiz bir sulu reaksiyondur. Yöntem oksidasyon ve bozunma ürünlerinin analizi yoluyla polisakkarit yapısının karakterize edilmesi amacıyla kullanılmaktadır[76]. Dekstranın glikoz kalıntısı, aynı kalıntı içinde iki farklı oksitlenebilir bağ sunan komşu diollere sahiptir. Diol oksidasyonu aldehit ile sonuçlanmaktadır. Dekstranın oksidasyon reaksiyonu Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Dekstran oksidasyonu[76]

Dekstranın periyodat oksidasyonu, dekstranın fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek zincir yapısının bozulması ile sonuçlanan sert bir reaksiyondur. Dekstrandaki oksitlenme derecesinin kontrolü, nihai özellikleri ve uygulamaları için son derece önemlidir. Oksitlenmiş dekstranın viskozitesi dekstrandaki daha yüksektir. Yüksek viskozite, belirli formülasyonların enjekte

edilebilirliğini ve homojenliğini bozabilir[77]. Oksitlenme derecesi bu makromonomerin nihai özelliklerini etkileyeceği için hidrojellerin verimli tasarımı için oksitlenme derecesi göz önüne alınmalıdır[78]. Oksitlenmiş dekstranın hidrofilik yapısı ve reaktivitesi, hidrojellerin sentezinde ana zincir veya çapraz bağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Aldehit grupları, kimyasal başlatıcılara ihtiyaç duymadan aminler ve hidroksil gruplarıyla reaksiyona girebilmektedir[76].

2.9. Enjekte Edilebilir Biyomalzemeler

Enjekte edilebilir biyomalzemelerin kullanımı kemik rejenerasyonunda minimal invaziv cerrahiye imkan tanımaktadır. Bu tür malzemeler cerrahların karmaşık cerrahi prosedürlere ihtiyaç duymadan kemik kusurlarını ele almasını sağlayarak iyileşme süresini ve hasta rahatsızlığını azaltmaktadır. Enjekte edilebilir bir biyomalzeme türü olan enjekte edilebilir hidrojeller, kemikteki düzensiz şekilli kusurlara uyum sağlama yetenekleri nedeniyle oldukça işlevseldir. Kolay uygulama ve boşlukların düzgün bir şekilde doldurulmasını sağlayarak malzemeyi çevreleyen dokuyla etkili bir şekilde bütünleştirmektedir. Ek olarak bu hidrojeller hücrel aktiviteler için destekleyici bir ortam sağlayarak doku oluşumunu ve rejenerasyonunu aktif olarak teşvik etmektedir. Tüm bu özelliklerin birleşimi, enjekte edilebilir biyomalzemeleri kemik iyileşmesi ve restorasyonu adına umut verici bir seçenek haline getirmektedir[79]. Son yıllarda, redoks ve fotobaşlatıcı rehberliğinde polimerizasyon dahil olmak üzere enjekte edilebilir bir hidrojel yapmak için çok sayıda yöntem kullanılmıştır. Ancak, başlatıcılara ve ışınlamaya uzun süreli maruz kalma sitotoksisteye neden olmaktadır[80]. Bu nedenle, enjekte edilebilir hidrojel ağlarının çapraz bağlanması için yumuşak bir ortam yaratmak önemlidir. Schiff baz reaksiyonu, amino grupları ve aldehit grupları aracılığıyla imin bağları oluşturan ılıman bir reaksiyondur. Schiff baz reaksiyonu polisakkarit bazlı enjekte edilebilir hidrojel sentezi için önemli bir yaklaşım sunmaktadır[81].

2.10. Literatür Araştırmaları

Hidroksiapatitin fiziksel ve kimyasal özelliklerini geliştirmek üzere Sr, Mg, Zn gibi elementlerle modifiye edildiği çalışmalar literatürde mevcuttur. Stronsiyum kemik mikromimarisini ve iyileşmesini teşvik etme adayı bir ajan olarak öne çıkmaktadır. Düşük miktarda stronsiyum ikamesi sonucu hidroksiapatitin mekanik özellikleri ve biyoaktivitesinin iyileştiği çalışmalarda rapor edilmiştir.

Xue ve diğerleri plazma püskürtmeli Sr-HA kaplamalarının biyouyumluluğuna ilişkin araştırmayı bildirmektedir. %10 mol Sr^{2+} içeren Sr-HA kaplamalar titanyum alaşımlı substratlar üzerinde üretilmiştir. Sr-HA kaplaması, OPC1 hücrelerinin tutunmasını desteklemiş ve yüzeyde daha fazla lokal temas üretilmiştir. Stronsiyum ikameli hidroksiapatit materyalin osteoblastlar ile yüksek derecede biyouyumluluğa sahip olduğunu sonucuna varılmıştır. ALP ekspresyonunu uyaran etmen hidroksiapatit yapısındaki stronsiyum içeriğidir. Sr-HA kaplamasının ECM oluşumu ve mineralizasyonu üzerinde zararlı bir etkisi bulunmamıştır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, stronsiyum içeriğine sahip hidroksiapatit materyalin yeni kemik oluşumunu uyardığını göstermiştir[82].

Kontoggianni ve diğerleri başlangıç malzemesi olarak kalsiyum, stronsiyum ve fosfor tuzları kullanılarak ıslak kimyasal çökeltme yoluyla %50 ve %100 kalsiyum ikame derecesine sahip nano boyutlu HA ve nano boyutlu SrHA (SrHA50 ve SrHA100) üretmiştir. Malzemeler MC3T3-E1 osteoblast öncül hücreler üzerindeki sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Nano yapılı HA ve SrHA bazlı malzemelerin sitouyumlu ve *in vitro* olarak geliştirilmiş osteogenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit bazlı materyaller daha yüksek kalsiyum ve kolajen üretimi göstermiştir. Tamamen stronsiyumdan oluşan hidroksiapatit materyalde alkalen fosfataz aktivitesi önemli bir artış göstermiştir. Gen ifadesi analizi, üç kompozisyon için de kontrol grubuna göre 14. günde osteonektin ve osteokalsinin önemli bir şekilde yukarı regülasyon gösterdiğini ortaya koymuştur[83].

Zhang ve diğerleri %0, %5, %10 ve %20 Sr^{2+} iyon konsantrasyonlarına sahip hidroksiapatit (HA), stronsiyum (Sr) ile birleştirilmiş hidroksiapatit (Sr5HA, Sr10HA, Sr20HA) olmak üzere dört tip biyoaktif biyoseramiği osteogenik ve anjiyojenik özellikleri açısından araştırmıştır. *In vitro* sonuçlar, Sr-HA'nın BMSC'lerin proliferasyonunu ve osteogenik farklılaşmasını artırabildiğini ve HUVEC'lerin proliferasyonunu ve anjiyojenik gen ekspresyonunu destekleyebildiğini göstermektedir[84].

Codrea ve diğerleri hidroksiapatitin çöktürme yöntemi ve hidrotermal yöntemi karşılaştırmıştır. Genel olarak, çöktürme yoluyla elde edilen örnekler hidrotermal sentez yöntemine kıyasla sitotoksite açısından üstün sonuçlar göstermiştir. Çöktürme yöntemiyle elde edilen SrHA daha düşük kristalliğe sahip olması nedeniyle kemik mineralinin fizikokimyasal özelliklerine daha yakın bulunmuştur[85].

Codrea ve diğerkleri stronsiyum ikameli nano hidroksiapatit içeren jelatin metakrilolil kompozit hidrojel iskeleler geliştirmiştir. Yöntemde UV foto-çapraz bağlama kullanılmıştır. *In vitro* hücre kültürü, osteoblastların hidrojin yüzeyine tutunduğunu ve çoğaldığını göstermektedir. Stronsiyum hidroksiapatit içeren GelMA hidroجلي yüksek biyoyumluluğa sahip olduğı sonucuna varılmıştır. Ayrıca fiziksel ve kimyasal karakterizasyon sonuçları nano boyutlu HA/SrHA'nın dahil edilmesinin GelMA'nın mekanik, şişme ve bozunma performanslarını iyileştirdiğini göstermektedir[86].

Dias ve diğerkleri Sr^{2+}/Mg^{2+} veya Sr^{2+}/Zn^{2+} eş-ikameli nano-hidroksiapatit (nHA) malzemeler sentezlenmiştir. Hidroksiapatit materyali kitosan/jelatin polimerleri ile birleştirerek kemik çimentosu geliştirilmiştir. Çimentolar sitotoksik özellik göstermemiştir. Eş-ikameli nHA içeren çimentolar, osteoblast yapışmasını ve hücre çoğalmasını iyileştiren yüksek sito-uyumluluğa sahip olduğı sonucuna varılmıştır. Çimentolar ALP ve NO üretimini artırarak ekstraselüler matris (ECM) mineralizasyonunu ve MC3T3-E1 hücrelerinin farklılaşmasını uyarmaktadır. nHA'nın %5 mol Sr ve %5 mol Mg ile birlikte ikame edilmesiyle oluşan çimento kemik rejenerasyonu açısından yüksek osteoindüktif kapasite göstermiştir[87].

Zhang ve diğerkleri ipek fibroin (SF), karboksimetil kitosan (CMC), selüloz nanokristaller (CNC) ve stronsiyum ikameli hidroksiapatit (SrHA) kullanarak SF/CMCS, SF/CMCS/CNC, SF/CMCS/CNC/SrHA kompozitler sentezlemiştir. SF/CMCS/SrHA/CNC iskelesi SF/CMCS iskeleleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek gözeneklilik göstermiştir. SF/CMCS yapı iskelesi ile karşılaştırıldığında SrHA ilave edilen yapı iskeleleri, gelişmiş protein adsorpsiyonu ve ALP aktivitesi göstermiştir[88].

Ullah ve diğerkleri titanyum alaşımı (Ti-6Al-4V) üzerinde farklı konsantrasyonlarda Sr^{2+} ve Zn^{2+} birlikte ikameli HA plazma spre y kaplama hazırlamıştır. Stronsiyum ve çinko ikameli kaplama saf hidroksiapatit kaplamadan daha yüksek biyoyumluluk göstermiştir. Ek olarak stronsiyum ve çinko ikamesi yüksek çözünme hızı ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, stronsiyum ve çinko ile birlikte ikame edilmiş kaplama hücre proliferasyonu, hücre tutunması ve ALP aktivitesi ile te yit edilen sitoyumluluk göstermiştir[89].

Yedekci ve diğerkleri hidroksiapatite farklı miktarlarda bor, stronsiyum ve magnezyum eş zamanlı katkılamıştır. Hücre canlılığı testinde en yüksek canlılık stronsiyum ve bor multi katkılı $2Sr_{0,5}B_{0,5}HA$ içeren iskelelerde gözlenmiştir. $2Sr_{0,5}B_{0,5}HA$ içeren yapı iskelelerindeki hücrelerin

spesifik ALP aktivite seviyesinin, kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur[90].

Zhang ve diğerleri stronsiyum hidroksiapatit ve grafenoksit nanokompozit yapılar geliştirmiştir. Fonksiyonel kaplama ortalama pürüzlülük ve orta derecede nano yapıli bir yüzey sergilemiş, osteoblast proliferasyonu ve farklılaşması için uygun bir temas yüzeyi sağlamıştır. Saf titanyum ile karşılaştırıldığında, SrHA/Va/GO kompozit kaplama, MC3T3-E1 hücrelerinin yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını önemli ölçüde destekleyici özellikte bulunmuştur[91].

Lei ve diğerleri stronsiyum/hidroksiapatit/kitosan (CS) nanohibrit yapı iskeleleri dondurarak kurutma yöntemiyle üretmiştir. Yapıdaki stronsiyum miktarının artışının bir sonucu olarak stronsiyum hidroksiapatitin kristal boyutları azalmıştır. Stronsiyumun kalsiyumdan daha büyük iyon çapı nedeniyle eksen uzunluklarını artmıştır. *In vitro* hücre deneyleri, tüm SrHAP/CS nanohibrit yapı iskelelerinin, insan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri için (hBMSC'ler) uygun tutunma, yayılma ve proliferasyona sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca SrHAP/CS nanohibrit yapı iskelelerinden salınan Sr^{2+} iyonları ALP aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir[92].

Wong ve diğerleri polietereeterketon (PEEK) polimer matrisine dahil edilen stronsiyum içeren hidroksiapatit (Sr-HA) kompozitleri sıkıştırılmalı kalıplama tekniği ile üretmiştir. *In vitro* kantitatif ölçümlere dayanarak, Sr-HA/PEEK kompozitinin HA/PEEK'ten daha yüksek biyolojik performans gösterdiği kanıtlanmıştır[93].

Khajuria ve diğerleri SrHA nanopartiküllerinin zoledronik asit tarafından modifikasyonu hakkında araştırmalar yapmıştır. Hidroksiapatit, stronsiyum ve zoledronik asit formülasyonunun deneysel osteoporoz terapisinde zoledronik asite göre daha uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır[94].

Yuan ve diğerleri farklı stronsiyum içeriklerine sahip hidroksiapatit materyalleri kimyasal çöktürme yöntemine dayalı olarak hazırlamıştır. *In vitro* hücre kültürü deneyleri, sentezlenen Sr katkıli HA/CS kompozit kaplamaların iyi bir biyoyumluluğa sahip olduğunu göstermiştir. %4 mol Sr iyon katkıli HA/CS kaplama hücre proliferasyonu, adezyon ve osteojenik farklılaşmaya daha elverişli bulunmuştur[95].

Zoledronik asitin hidroksiapatit ile birlikte kullanıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Lu ve diğerleri zoledronik asit içeren kitosan/nano hidroksiapatit/zoledronik asit materyal hazırlamıştır. Hazırlanan iskelelerin, zoledronik asit içermeyen iskelelere kıyasla daha iyi biyouyumluluğa sahip olduğu görülmüştür. İskeleler *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Tüm bu genel bulgular hazırlanan CS/nHA/Zol yapı iskelelerinin kemik onarımı ve antibakteriyel özellik konusunda potansiyel sahibi olduğunu başarıyla göstermiştir[96].

Boanini ve diğerleri kemik protezleri için stronsiyum ve zoledronik asit içeren kompozit kaplamalar geliştirmiştir. Titanyum substratlar üzerinde çeşitli stronsiyum ikameli hidroksiapatit (SrHA) ve zoledronik asit modifiye hidroksiapatit (ZOLHA) bileşimleriyle matriks destekli darbeli lazer buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Osteoblast benzeri MG-63 hücreler kaplamalar üzerinde kültürlenmiştir. Sonuçlara göre hem stronsiyum hem de zoledronik asit hücre dışı matriks birikimini arttırmaktadır. Zoledronik asit tip 1 kolajen üretimini desteklerken, stronsiyum alkalen fosfataz üretimini arttırmaktadır[59].

Xue ve diğerleri karvarial kemik kusurlarının restorasyonu için biyolojik olarak parçalanabilen, nano hidroksiapatit/karboksimetil kitosan/zoledronik asit biyokompozitini geliştirmiştir. Osteoblast benzeri MG-63 hücreler kullanılarak yapılan değerlendirmede kompozit sitouyumluluk göstermiştir[97].

Stronsiyum ve zoledronik asitin eş zamanlı varlığının hidroksiapatitin doğrudan sentezi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada zoledronik asitin iki farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. Hem stronsiyum ilavesi, hem de zoledronik asit ilavesi hidroksiapatit nanokristallerin boyutlarını etkilemektedir. Osteoblast benzeri MG-63 hücre kültürü zoledronik asitin osteoklast aktivitesi üzerinde stronsiyumdan daha büyük bir inhibisyon etkisi yarattığını göstermektedir. Sonuçlara göre ağırlıkça yaklaşık %4 zoledronik asit ve %4 stronsiyum içeren hidroksiapatit ve ağırlıkça yaklaşık %4 zoledronik asit ve %8 stronsiyum içeren hidroksiapatit yapısı osteoblast teşviki ve osteoklast inhibisyonu için en iyi sonucu vermiştir[58].

Rodan ve diğerleri farklı oranlarda zoledronik asit içeriğine sahip hidroksiapatit nanokristaller sentezlemiştir. Zoledronik asit içeriği ile hidroksiapatitin kristal boyutu arasındaki ilişki aydınlatılmıştır. Osteoblast benzeri MG-63 hücreleri HA-ZA nanokristalleri üzerinde

kültürlenmiş ve sonuç olarak HA-ZA yapısı osteoblast proliferasyonunu ve aktivitesini destekleyici, osteoklast oluşumunu önleyici ve osteoklast apoptozunu destekleyici yapıda bulunmuştur[57].

Fang ve diğerleri zoledronik asit ile fonksiyonelleştirilmiş hidroksiapatit biyomateriyaller üretmiştir. Çalışmada hidroksiapatit kimyasal çöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır. Materyallerin karakterizasyonları, zoledronik asit ilavesinin kristallliği azalttığını ve hidroksiapatit morfolojisini kısa çubuk şeklinden mikroküreye dönüştürdüğünü, hibrit nanobiyomalzemenin mikro yapısını değiştirdiğini doğrulamıştır. Diğer reaksiyon koşulları değişmeden kalarak farklı zoledronik asit içeriğine sahip materyal elde edilmiştir[98].

Literatürde hidroksiapatit içeren enjekte edilebilir hidrojel çalışmaları oldukça sınırlıdır. Chuysinuan ve diğerleri hidroksiapatit içeren enjekte edilebilir fibroin-aljinat kompozit hidrojel geliştirmiştir. Karakterizasyon sonuçları hidroksiapatit-fibroin-aljinat hidrojelin dental iskele malzemesi olarak potansiyel taşıdığını göstermiştir[99].

Cao ve diğerleri polisakkarit bazlı enjekte edilebilir nano hidroksiapatit hidrojel geliştirmiştir. *In vivo* kraniyal kemik onarım sonuçları kompozit malzemenin yüksek kemik onarım etkisini göstermiştir[100].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir. Çalışma kapsamındaki hidroksiapatit - stronsiyum hidroksiapatit nanopartiküllerinin sentezi, zoledronik asit ile nanopartiküllerin modifiye edilmesi, karboksimetil kitosan ve oksitlenmiş dekstran yapılarının sentezi, hidroksiapatit - stronsiyum hidroksiapatit ve zoledronik asit ile modifiye edilmiş hidroksiapatit - stronsiyum hidroksiapatit nanopartikül içeren kompozit hidrojellerin üretimi detaylandırılmıştır. Sentezlenen tüm malzemelerin kimyasal yapıları ve özellikleri aydınlatılmıştır. Ek olarak malzemelerin kemik doku mühendisliğindeki kullanım potansiyelleri *in vitro* hücre kültür çalışmaları yapılarak incelenmiş ve yorumlanmıştır.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Kalsiyum nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, %99), stronsiyum nitrat ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ %99,5), sodyum fosfat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, %98), sodyum hidroksit (NaOH , %97), zoledronik asit (Farmasötik ikincil standart), kitosan (Orta molekül ağırlığı), izopropanol (%99,5), etanol (%99,5), hidroklorik asit (HCl , %37), kalsiyum asetat ($\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, (%99) Sigma-Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır. Kloroasetik asit ($\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, %99) Thermo Scientific Chemicals'tan (ABD) sağlanmıştır. Dekstran (*Leuconostoc Mesenteroides*, m_w : 35,000-45,000), sodyum(meta)periyodat (NaIO_4 , %99) ve etilenglikol ($(\text{CH}_2\text{OH})_2$, %99) Sigma-Aldrich'ten (ABD) sağlanmıştır. Fare osteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı (CRL-2593) ATCC'den (Manassas, Virginia, ABD) satın alınmıştır. Dulbecco Modifiye Eagle Medium (DMEM), MTT ve dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır. Fetal Sığır Serum (FBS), Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) çözeltisi ve Pierce™ LDH Sitotoksosite Test Kiti Thermo Fisher'dan (Massachusetts, ABD) satın alınmıştır. Canlılık/Sitotoksosite Test Kiti Biotium'dan (ABD) sağlanmıştır. Alkalen Fosfataz (ALP) Testi Kiti (MAK447) ve Kalsiyum Kolorimetrik Test Kiti (MAK022) Sigma-Aldrich'ten (ABD) elde edilmiştir. Antibakteriyel test için *Escherichia Coli* (35218) ve *Staphylococcus Aureus* (29213) bakteri suşları ATCC'den (Manassas, Virginia, ABD) satın alınmıştır. Besi ortamı ve Bakteriyolojik Agar Condalab'dan (Madrid, İspanya) satın alınmıştır.

3.2. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin Sentezi

Hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit yapıları başlangıç kimyasalları olarak $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak sentezlenmiştir. Sentez, daha önce açıklanan çöktürme yöntemi ile küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir[101]. Çalışmada saf hidroksiapatit (HA), %5 (a/a) stronsiyum içeren hidroksiapatit (HA5Sr), %10 (a/a) stronsiyum içeren hidroksiapatit (HA10Sr) ve %15 (a/a) stronsiyum içeren hidroksiapatit (HA15Sr) nanopartikülleri sentezlenmiştir. Yönteme göre 1,67'lik Ca/P ve (Ca+Sr)/P stokiometrik oranlarına sahip kalsiyum nitrat (0,1M), stronsiyum nitrat (0,1M), trisodyum fosfat çözeltileri (0,1M) deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan kalsiyum nitrat ve stronsiyum nitrat çözeltileri trisodyum fosfat çözeltisine damla damla eklenmiş ve çözelti oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Hazırlanan NaOH çözeltisi (0,1M) ile pH değerinin yaklaşık 10'a getirilmesiyle hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit kristallerinin çökeltme koşulları oluşturulmuştur. Elde edilen karışım vakum altında süzülüş, beyaz renkli çökelti deiyonize su ile yıkanmış ve 90°C'de 8 saat etüvde kurutulmuştur. Nanotozlar 600°C'de 2 saat kalsine

edilerek sonraki aşamada kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.3. Zoledronik Asit Modifiye Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Sentezi

Bu aşamada, hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit nanopartikülleri belirli oranlarda zoledronik asit ile modifiye edilmiştir. Zoledronik asitin sodyum hidroksit çözeltisinde yüksek çözünürlüğü nedeniyle sodyum hidroksit ilaç yükleme ortamı olarak seçilmiştir. Hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit katı materyallerine göre, %5 (a/a) ve %7,5 (a/a) zoledronik asit ayrı ayrı NaOH (0,1 M) içinde çözülmüştür. Daha sonra, bu çözeltiler ve hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit katı materyalleri ayrı şişelere alınmış ve manyetik karıştırıcı ile 12 saat karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra, çözeltiler katı materyali çöktürmek için 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak katı materyal liyofilize edilerek kurutulmuştur.

3.4. Karboksimetil Kitosan Sentezi

o-Karboksimetil kitosan (o-CMC), daha önce bildirilen bir çalışmadan[102] küçük değişikliklerle sentezlenmiştir. Orta molekül ağırlıklı kitosan (5 g), izopropanolde (50 mL) dağıtılmıştır. %50 (a/h) NaOH çözeltisi (20 mL) hazırlanarak karışıma eklenmiştir. Son olarak, kloroasetik asit (3 g) izopropanolde (10 mL) çözülerek reaksiyon karışımına damla damla eklenmiş ve 50°C'de 6 saat reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon %70 etanol çözeltisi ile sonlandırıldıktan sonra CMC sodyum tuzu filtrelenmiştir. %70 etanol ile birkaç kez yıkanmış ve o-CMC elde etmek için HCL/etanol çözeltisinde karıştırılmıştır. Son olarak o-CMC filtre edilerek vakumda kurutulmuştur.

o-CMC'nin karboksil içeriği belirtilen yöntemle[103] göre belirlenmiştir. o-CMC (0,5 g) %2 (w/w) kalsiyum asetat çözeltisinde (50 mL) dağıtılmıştır. Süspansiyon, indikatör olarak fenolftalein kullanılarak NaOH çözeltisi (0,1N) ile titre edilmiştir. Numunedeki karboksilik içerik, Denklem 1 referans alınarak hesaplanmıştır. N hazırlanan NaOH çözeltisinin normalitesi, V ise titrasyonda harcanan NaOH hacmi (mL)'dir.

$$COOH \text{ İçeriği (\%)} = \frac{N \cdot V \cdot Mw \text{ COOH}}{CMC \text{ (mg)}} \times 100 \quad \text{Denklem 1}$$

3.5. Oksitlenmiş Dekstran Sentezi

Oksitlenmiş Dekstran (O-Dex) bildirilen çalışma referans alınarak sentezlenmiştir[77]. Dekstran (1 g) deiyonize suda (10 mL) çözülmüştür. Sodyum periyodat (0,5 g) 5 mL deiyonize suda çözünerek dekstran çözeltisine eklenmiş ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 4 saat reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon etilenglikol (1 mL) ile sonlandırılmıştır. Çözelti selüloz membranda deiyonize su ile üç gün boyunca diyaliz edilmiş ve diyaliz suyu günde iki kez değiştirilmiştir. Son olarak O-Dex liyofilizasyon ile elde edilmiştir. O-Dex'in oksidasyon derecesi (aldehit grubu içeriği) titrasyon yapılarak belirlenmiştir[104]. 0,1 g kurutulmuş O-Dex 25 mL 0,25 N hidroksilamin hidroklorür (NH₂OH.HCl) çözeltisinde çözülmüştür. Karışım manyetik karıştırıcıda 2 saat boyunca karıştırılmış ve 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Oksitlenmiş dekstran yapısında bulunan aldehit içeriği Denklem 2 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$CHO \text{ İçeriği (\%)} = N \cdot V \cdot (MW_{dex} / m_{dex}) \cdot (100 / S) \cdot 10^{-3} \quad \text{Denklem 2}$$

N NaOH çözeltisinin normalitesini, V ise titrasyonda harcanan NaOH çözeltisinin hacmini ifade etmektedir. MW_{dex} dekstranın moleküler ağırlığı, m_{dex} ise deneyde kullanılan dekstranın ağırlığını ifade etmektedir. S dekstrandaki glikoz alt birimi sayısıdır. Oksitlenmiş dekstran yapısındaki aldehit grubu içeriği %40,5 olarak hesaplanmıştır.

3.6. Karboksimetil Kitosan / Oksitlenmiş Dekstran Hidrojellerin Sentezi

Polisakkarit bazlı enjekte edilebilir hidrojeller Schiff baz çapraz bağlamasına dayalı olarak sentezlenmiştir. o-CMC ve O-Dex çözeltileri (%2 a/h ve %2,5 a/h) PBS çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Nanopartikül içeren kompozit hidrojeller hazırlamak için, hidroksiapatit nanopartikülleri %1 (a/h) O-Dex çözeltisinde dağıtılmıştır. Daha sonra hidroksiapatit içeren O-Dex çözeltisi o-CMC çözeltisine eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Aynı prosedür farklı içeriklere sahip her hidroksiapatit, stronsiyum hidroksiapatit ve zoledronik asit modifiyeli hidroksiapatit nanopartikül için uygulanmıştır.

3.7. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit nanopartiküllerinin morfolojik

özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi (Gaia 3, Tescan, Çekya) ile incelenmiştir. Analizden önce numuneler karbon püskürtme ile kaplanmıştır. Numunelerin elementel içeriğini belirlemek için Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektroskopisi (EDS) kullanılmıştır. Toz numunelerin faz analizi XRD (X-Işını Kırınımı) (PANalytical Empyrean) analizi ile yapılmıştır. Seçilen $5^{\circ}(2\theta)$ ila $90^{\circ}(2\theta)$ tarama aralığında, yoğunluk verileri Cu-K α radyasyonu ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$) (voltaj = 45 kV ve akım = 40 mA) kullanılarak 0,1°/dakikalık bir adım taramasıyla toplanmıştır. Numunelerin fazlarını belirlemek için standart JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) içerikleriyle karşılaştırmalar yapılmıştır.

3.8. Zoledronik Asit Modifiyeli Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Zoledronik asit modifiyeli hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit materyallerinin elementel içeriği EDS analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca zoledronik asit modifikasyonunun hidroksiapatit nanopartiküllerinin kristal yapısı üzerindeki etkisi XRD ile analiz edilmiştir.

3.9. CMC/OD Hidrojellerinin Karakterizasyonu

CMC/OD hidrojel yapılar fizikokimyasal açıdan SEM, FTIR analizleri ile karakterize edilmiştir. Ek olarak CMC/OD hidrojellerin reolojik ölçümleri ve degradasyon davranışı incelenmiştir.

3.9.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

o-CMC ve O-Dex yapılarının FTIR analizi, kitosan yapısındaki karboksimetilasyonu ve dekstran yapısındaki oksidasyonu kanıtlamak için gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sentezlenen Schiff bazlı hidrojel yapısının fonksiyonel grupları FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında 8 cm^{-1} çözünürlüğe sahip Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR, Thermo Fisher, ABD) kullanılmıştır. Her spektrum için ortalama 16 tarama yapılmıştır.

3.9.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Sentezlenen CMC/OD hidrojel ve hidroksiapatit nanopartikül içeren CMC/OD hidrojelinin morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile değerlendirilmiştir. Örnekler 48 saat dondurularak kurutulmuştur. Ve liyofilize edilmiş örneklerin yüzeyleri SEM analizinden önce 5 nm karbon ile kaplanmıştır.

3.9.3. Reolojik Ölçümler

Sentezlenen hidrojellerin akışkan özellikleri Kinexus (Malvern, İngiltere) reometresi kullanılarak değerlendirilmiştir. Elastik modülü (G') ve kayıp modülünü (G'') belirlemek için 25°C'de, 0,1-10 Hertz frekans aralığında ve %1,5 kayma gerilmesinde frekans taramaları yapılmıştır.

3.9.4. Degradasyon Analizi

Hidroksiapatit nanopartikül içeren ve hidroksiapatit nanopartikül içermeyen hidrojel gruplarında bozunma testi yapılmıştır. Örnekler 4 haftalık bozunma çalışması için liyofilize edilmiştir. Hidrojeller 37°C'de PBS (10 mL) ile inkübe edilmiştir. PBS günlük olarak değiştirilmiştir. Hidrojellerin bozunması, liyofilizasyondan sonra ağırlık kayıplarını değerlendirilerek Denklem 3'teki gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Degradasyon (\%)} = \frac{W_0 - W_r}{W_0} \times 100 \quad \text{Denklem 3}$$

3.10. In Vitro Sitouyumluluk Analizi

CMC/OD hidrojeller ve hidroksiapatit içeren CMC/OD hidrojellerin sitouyumluluk özellikleri MTT, LDH, canlı/ölü hücre boyama, alkalen fosfataz aktivitesi ve kalsiyum birikim analizleri ile incelenmiştir. Ek olarak CMC/OD ve CMC/OD/HA hidrojellerin ktibakteriyel özellikleri incelenmiştir.

3.10.1. MTT Testi

MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 Difeniltetrazolium Bromür] testi bildirilen protokole göre gerçekleştirilmiştir[105]. 96 kuyulu plakalarda, kuyu başına 1×10^4 MC3T3-E1 hücre ekilmiştir.

Hücreler 24 saat boyunca çeşitli CMC/OD hidrojel özütlerine maruz bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, ortama MTT (0,5 mg/mL) eklenmiş ve 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Formazan kristallerinin çözülmesi amacıyla, ortama hazırlanan dimetil sülfoksit çözeltisi eklenerek formazan çöktürülmüştür. EnSight™ Mikroplaka Okuyucusu (Perkin Elmer, Massachusetts, ABD) kullanılarak 570 nm'deki absorbans ölçülmüştür.

3.10.2. LDH Testi

Hücreler (1×10^4 hücre/kuyu) 96 kuyulu plakalarda kültüre edilmiş ve ardından 24 saat boyunca farklı içeriklere sahip CMC/OD hidrojellerinin özütleriyle muamele edilmiştir. Pierce™ LDH Sitotoksosite Testi Kiti kullanılarak üst sıvılardaki LDH seviyelerinin ölçülmesiyle sitotoksosite değerlendirilmiştir. 680 nm referans dalga boyuna sahip bir mikro plaka okuyucu (PerkinElmer, Massachusetts, ABD) kullanılarak 490 nm'deki absorbans okunmuştur.

3.10.3. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Canlılık/Sitotoksosite Test Kiti, hücre canlılığını ve sitotoksositeyi değerlendirme amacıyla, üreticinin talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır[106]. Hücreler etidyum homodimer-III (4 μ M) ve kalsein-AM (2 μ M) ile muamele edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Floresan mikroskop (EVOS FLoid) kullanılarak elde edilen görüntüler değerlendirilmiştir.

3.10.4. Alkalen Fosfataz (ALP) Testi

Alkalen Fosfataz Test Kiti, ALP aktivitesini ölçmek amacıyla, üreticinin protokolüne göre kullanılmıştır[107]. Kısaca, MC3T3-E1 hücreleri farklı formülasyonlu yeni sentez jeline ekilmiş ve ALP seviyeleri 1, 4 ve 7 gün boyunca ölçülmüştür. Ölçülen reaksiyon hızı ile enzim aktivitesi ilişkilidir. Hücre kültürü ortamı doğrudan analiz edilmiştir. Her numune (50 μ L) 96 kuyulu bir plakaya alınmış ve çok kanallı bir pipet kullanılarak çalışma reaktifi (207 μ L) eklenmiştir. Çalışma reaktifi, deney tamponu (200 μ L), magnezyum asetat (5 μ L) (0.2M) ve pNPP sıvısı (2 μ L) (1M) içermektedir. Distile su (200 μ L) (boş kuyu) ve kalibratör (200 μ L), 96 kuyulu plakanın ayrı kuyularına aktarılmıştır. Plaka okuyucusunda 405 nm'deki optik yoğunluk hemen ($t = 0$ dk) ve 4 dakika sonra ($t = 4$ dk) tekrar okunmuştur. Tüm deneyler üç kez gerçekleştirilmiştir.

3.10.5. Kalsiyum Birikim Analizi

Kalsiyum seviyeleri, kalsiyum kolorimetrik deney kiti kullanılarak üreticinin talimatlarına göre belirlenmiştir[108]. Hücreler, farklı formülasyona sahip hidrojellere ekilmiş ve Ca^{+2} seviyeleri 1, 4, 7 gün boyunca ölçülmüştür. Her numune (50 μL) 96 kuyulu bir plakaya alınmıştır. Standartlar ve numuneler içeren her kuyuya kromojenik reaktif (90 μL) eklenmiş ve ardından hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra her kuyuya kalsiyum analiz tamponu (60 μL) eklenmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. Reaksiyon oda sıcaklığında karanlık ortamda 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, EnSight™ Çok Modlu Mikroplak Okuyucu (Perkin Elmer, Massachusetts, ABD) kullanılarak belirtilen dalga boyunda (575 nm) absorbanlar ölçülmüştür. Tüm deneyler üç kez gerçekleştirilmiştir.

3.10.6. Antibakteriyel Aktivite

Hidrojellerin antimikrobiyal aktivitesi, agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir[109]. G-negatif *Escherichia Coli* (ATCC 35218) ve g-pozitif *Staphylococcus Aureus* (ATCC 29213), 24 saat boyunca besin ortamında 37°C'de alt kültüre edilmiştir. Bir gecelik kültürler alındıktan ve bulanıklık 0,5 McFarland standardına düzeltildikten sonra, son aşısı ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) agar plakalarına plaka edilmiştir. Agar plakaları daha sonra hem negatif/çözücü kontrolü hem de bakteriler için pozitif kontrol (50 $\mu\text{g/mL}$ streptomisin ve penisilin) görevi gören hidrojelden 100 μL ile doldurulmuştur. Plakalar daha sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Hidrojellerin inhibisyon bölgesi (ZOI) genişliği ölçülmüş ve antibakteriyel aktivitelerini değerlendirmek için kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Her ölçüm üç kez gerçekleştirilmiştir[110].

3.10.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Prism 8 (GraphPad Software Inc., California, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki sonuçları karşılaştırmak için post hoc testler olarak Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi ve tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. SE ile yapılan üç farklı biyolojik deneyin ortalaması gösterilmektedir. Aşağıdakiler anlamlı p değerlerinin örnekleridir: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) ve $p < 0,0001$ (****).

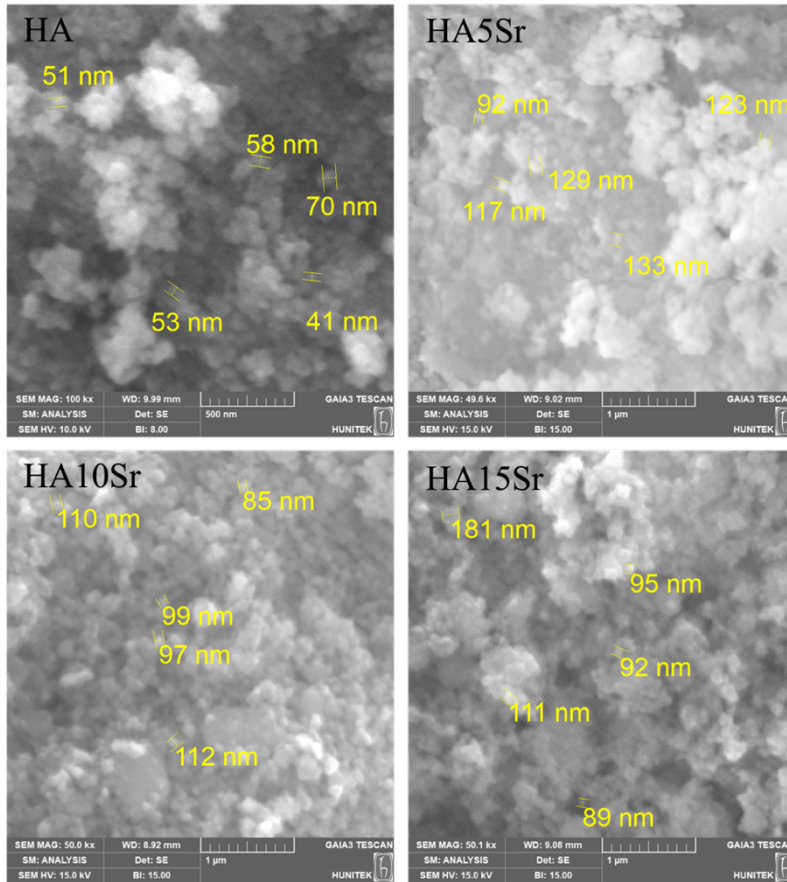
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) nanopartiküller SEM, EDS ve XRD analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

4.1.1. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin SEM Analizi

Hidroksiapatit (HA), HA5Sr, HA10Sr ve HA15Sr numunelerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 4.1’te verilmiştir.



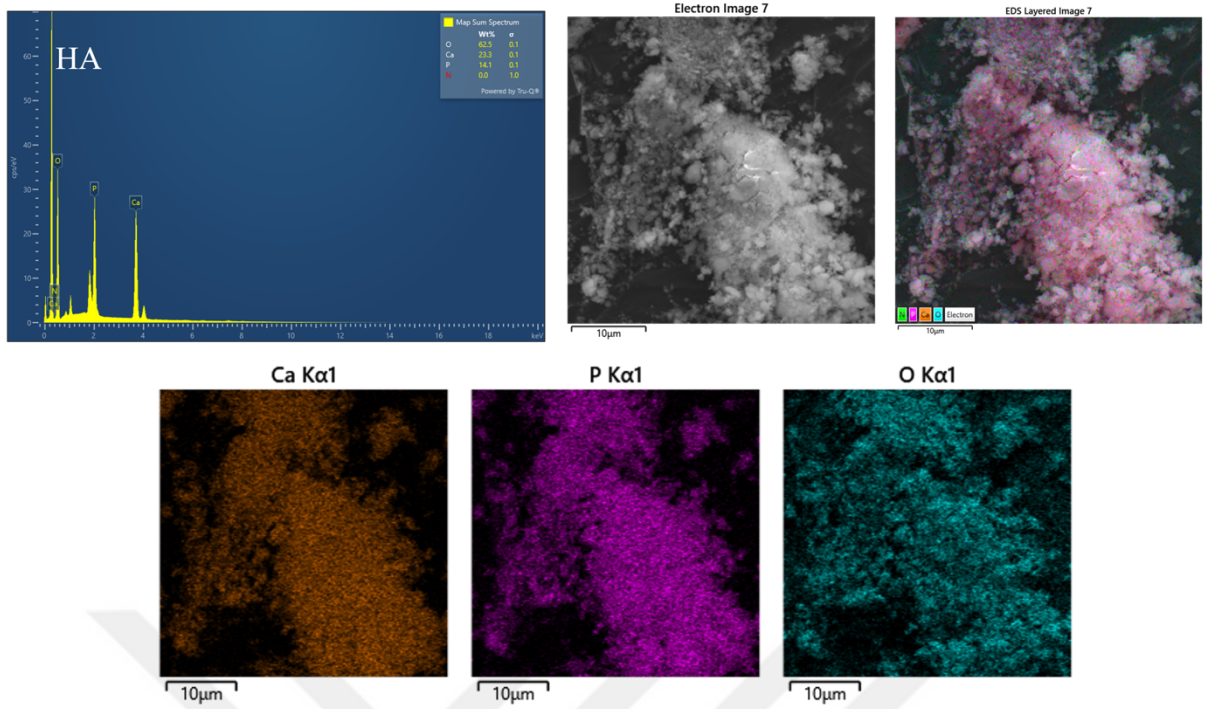
Şekil 4.1. Saf hidroksiapatit (HA) ve farklı miktarlarda stronsiyum içeren hidroksiapatitin

(HA5Sr, HA10Sr, HA15Sr) sırasıyla 100 kx, 49,6 kx, 50 kx ve 50,1 kx büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

SEM görüntüleri Şekil 4.1'de gösterildiği gibi apatit benzeri yapıların gelişimini ortaya koymaktadır. Tüm gruplarda gözlemlenen partikül boyutlarının tipik olarak 50 ile 130 nanometre arasında değiştiği görülmektedir. Bu durum tutarlı bir nano ölçekli boyuta işaret etmektedir. Bu nano boyutlu hidroksiapatit partikülleri, onları mikro boyutlu benzerlerinden ayıran birkaç dikkate değer özellik sergilemektedir. Özellikle, artan yüzey alanı, yüksek çözünürlük ve üstün biyouyumluluğa sahip olmaları, onları çeşitli biyomedikal uygulamalar için özellikle avantajlı hale getirmektedir. Partiküllerin küçük boyutu, bu özelliklere önemli ölçüde katkıda bulunarak biyolojik sistemlerle daha fazla etkileşim sağlamaktadır. Bu özellik nano boyutlu hidroksiapatite olağanüstü biyoaktivite kazandırmakta ve onu daha büyük kristal yapılara kıyasla biyomedikal alanlardaki uygulamalar için daha avantajlı hale getirmektedir[111]. SEM analizindeki tüm grupların morfolojisi küresel görünmektedir. Artan stronsiyum içeriği nanotozların morfolojik yapısında açıkça bir değişiklik yaratmamıştır.

4.1.2. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin EDS Analizi

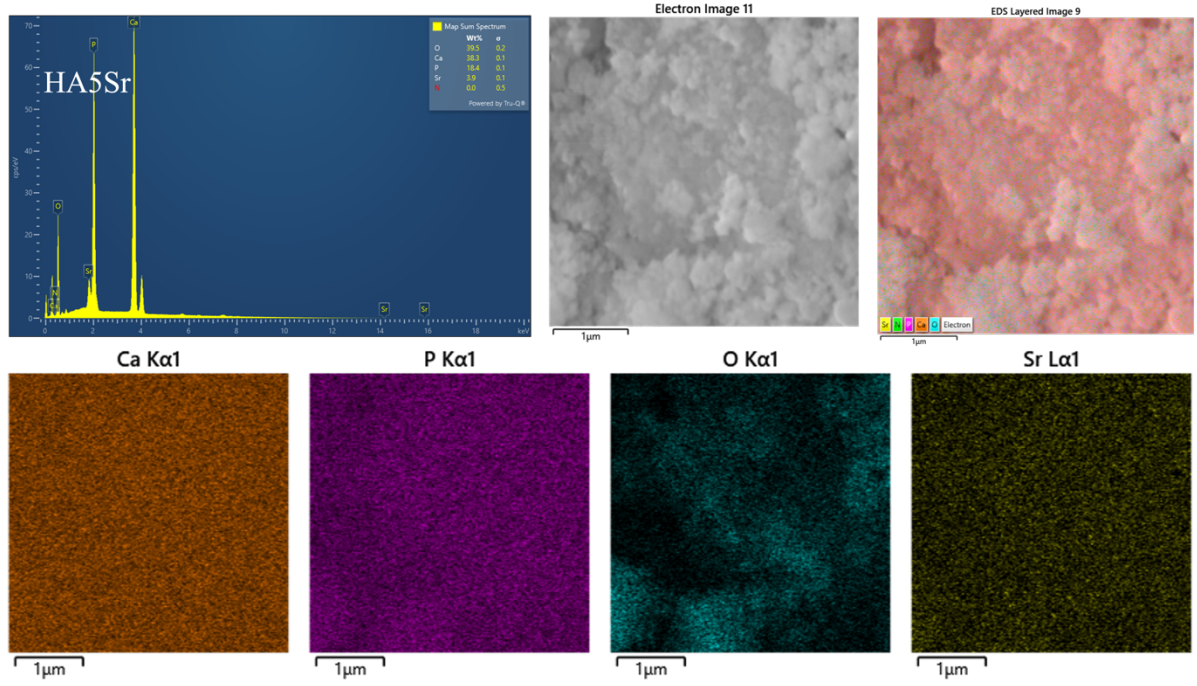
Saf hidroksiapatit (HA) materyalin element içerikleri ve EDS görüntü desenleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Saf hidroksiapatit (HA) materyalin elementel içeriği ve EDS görüntü desenleri

EDS analizi sonucu saf hidroksiapatite ait element içeriği $62,5 \pm 0,1$ oksijen, $23,3 \pm 0,1$ karbon ve $14,1 \pm 0,1$ fosfor olarak bulunmuştur. Kalsiyum, fosfor ve oksijen desenlerinin birbiriyle uyumlu olduğu görülmektedir.

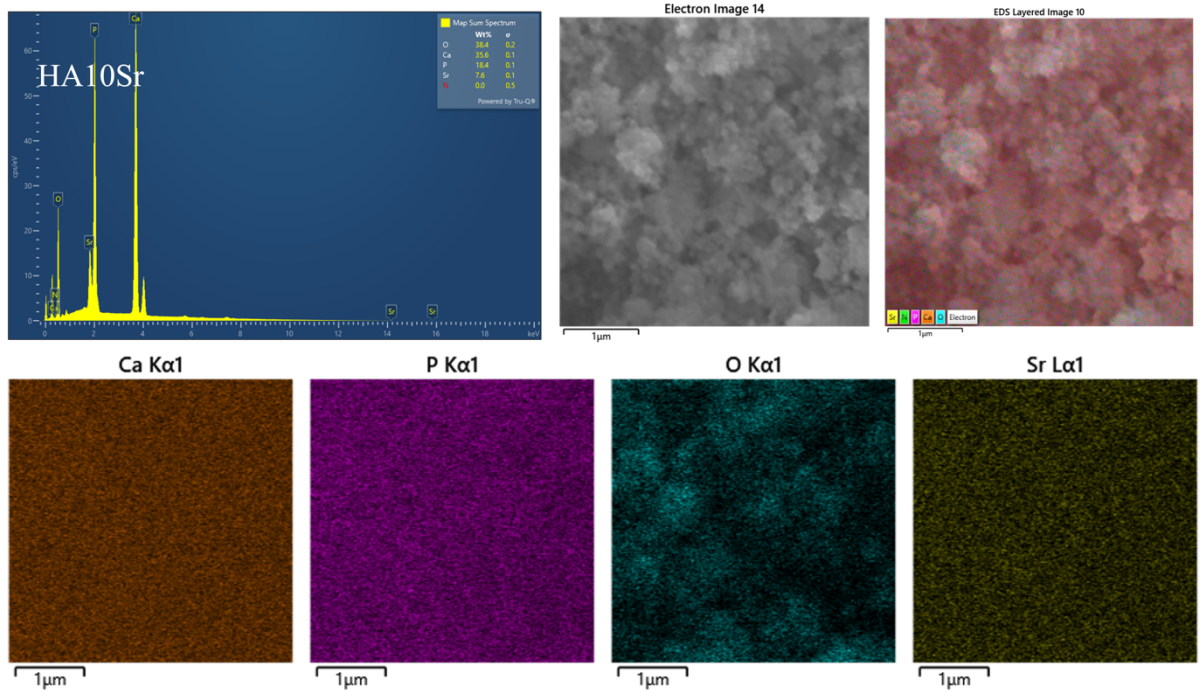
%5 Stronsiyum içeren hidroksiapatit (HA5Sr) materyalin element içerikleri ve EDS görüntü desenleri Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. %5 Stronsiyum içeren hidroksiapatit (HA5Sr) materyalin elementel içeriği ve EDS görüntü desenleri

EDS analizi sonucu %5 stronsiyum içeren hidroksiapatite (HA5Sr) ait element içeriği $39,5 \pm 0,2$ oksijen, $38,3 \pm 0,1$ kalsiyum, $18,4 \pm 0,1$ fosfor ve $3,9 \pm 0,1$ stronsiyum olarak bulunmuştur. EDS element haritası, kalsiyumun HA5Sr grubunda stronsiyum ile yer değiştirdiğini doğrulamaktadır. Atom yüzdeleri kullanılarak hesaplanan stokiyometrik $(\text{Ca} + \text{Sr}) / \text{P}$ oranı HA5Sr için 1,69 olarak hesaplanmıştır.

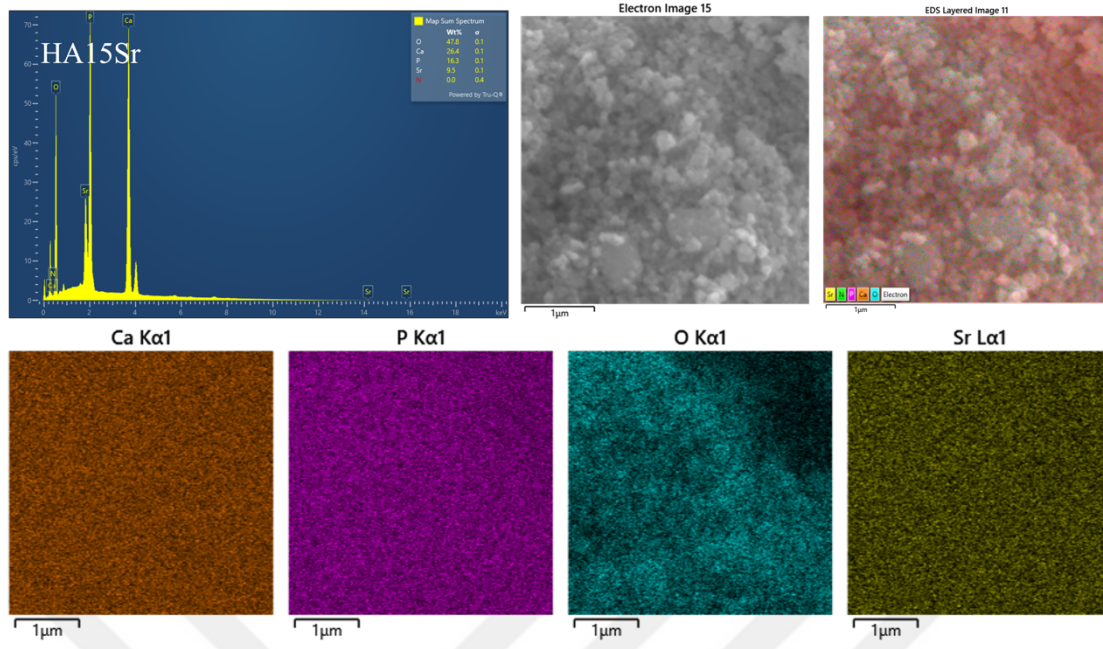
%10 Stronsiyum içeren hidroksiapatit (HA10Sr) materyalin element içerikleri ve EDS görüntü desenleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. %10 Stronsiyum içeren hidroksiapatit (HA10Sr) materyalin elementel içeriği ve EDS görüntü desenleri

EDS analizi sonucu %10 stronsiyum içeren hidroksiapatite (HA10Sr) ait element içeriği $38,4 \pm 0,2$ oksijen, $35,6 \pm 0,1$ kalsiyum, $18,4 \pm 0,1$ fosfor ve $7,6 \pm 0,1$ stronsiyum olarak bulunmuştur. EDS element haritası, kalsiyumun HA10Sr grubunda stronsiyum ile yer değiştirdiğini doğrulamaktadır. Atom yüzdeleri kullanılarak hesaplanan stokiometrik $(Ca + Sr) / P$ oranı HA10Sr için 1,62 olarak hesaplanmıştır.

%15 Stronsiyum içeren hidroksiapatit (HA15Sr) materyalin element içerikleri ve EDS görüntü desenleri Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. %15 Stronsiyum içeren hidroksiapatit (HA15Sr) materyalin elementel içeriği ve EDS görüntü desenleri

EDS analizi sonucu %15 stronsiyum içeren hidroksiapatite (HA15Sr) ait element içeriği $47,8 \pm 0,1$ oksijen, $26,4 \pm 0,1$ kalsiyum, $16,3 \pm 0,1$ fosfor ve $9,5 \pm 0,1$ stronsiyum olarak bulunmuştur. EDS element haritası, kalsiyumun HA15Sr grubunda stronsiyum ile yer değiştirdiğini doğrulamaktadır. Atom yüzdeleri kullanılarak hesaplanan stokiometrik $(Ca + Sr) / P$ oranı HA15Sr için 1,48'dir.

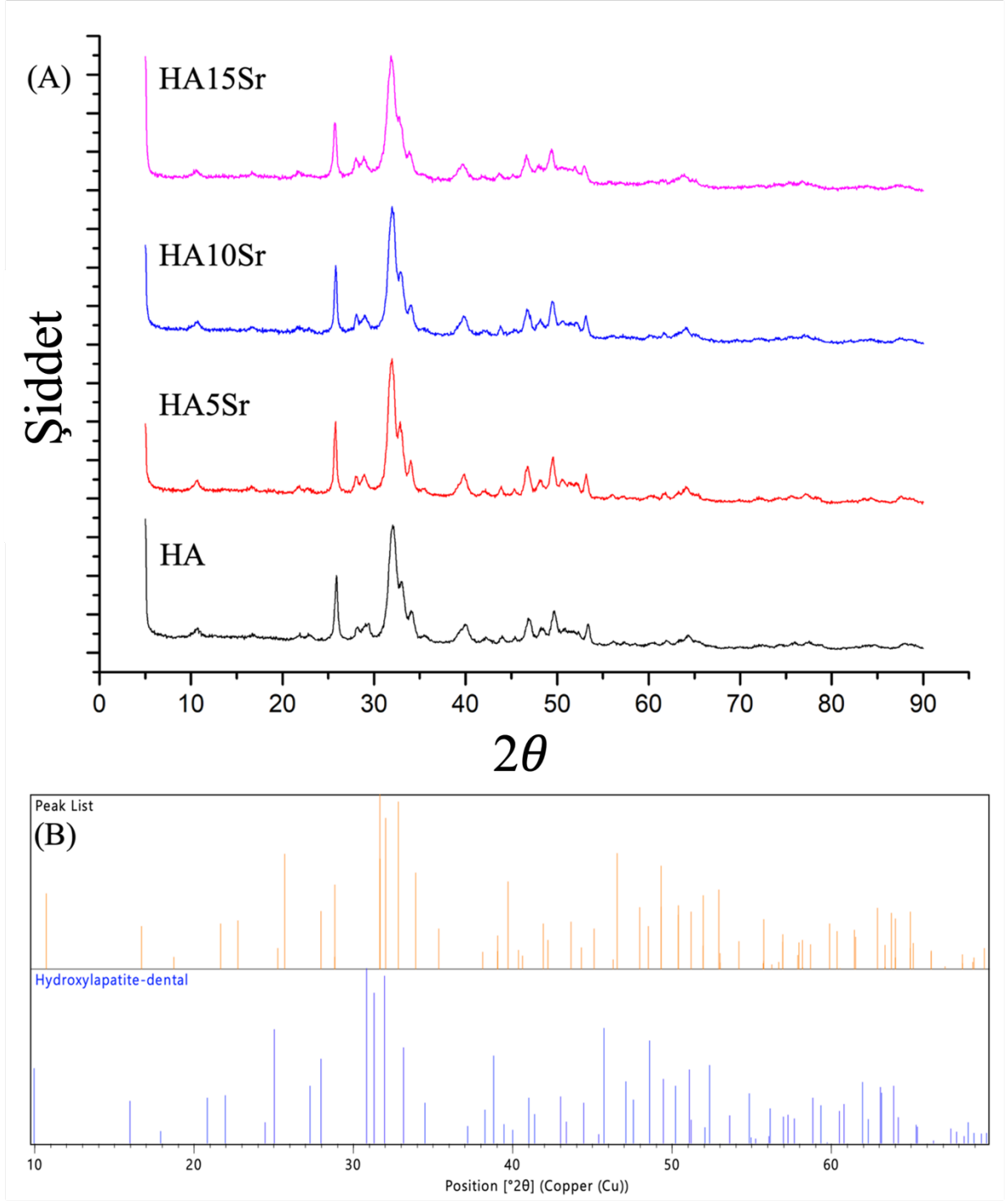
Elementel içeriklere ek olarak EDS element haritası, kalsiyumun tüm HA5Sr, HA10Sr ve HA15Sr gruplarında farklı oranlarda stronsiyum ile yer değiştirdiğini doğrulamıştır. Sr^{2+} (0,12 nm), Ca^{2+} (0,099 nm) ile benzer bir iyonik yarıçapa sahip olması nedeniyle hidroksiapatit yapısında kalsiyumun yerini alabilmektedir[112]. İlgili çalışma, stronsiyumun hidroksiapatit kafesine girdiğini doğrulamaktadır. Ayrıca stronsiyum içeriğinin mekanik mukavemeti artırdığını göstermektedir[113]. EDS ile yapılan element analizi, HA5Sr, HA10Sr ve HA15Sr gruplarında stronsiyum içeriklerinin sırasıyla $3,9 \pm 0,1$, $7,6 \pm 0,1$ ve $9,5 \pm 0,1$ olduğunu göstermiştir. Atom yüzdeleri kullanılarak hesaplanan stokiometrik $(Ca + Sr) / P$ oranları HA5Sr, HA10Sr ve HA15Sr için sırasıyla 1,69, 1,62 ve 1,48'dir. Çeşitli oranlarda sentezlenen stronsiyum hidroksiapatit materyallerinin $(Ca + Sr) / P$ oranı 1,5-1,6 aralığında bulunmuş ve kalsiyum eksikliği 1,6764'lük stokiometrik orana göre açıklanmıştır. Stokiometrik $(Ca + Sr) / P$ oranının azalması ile yapıdaki stronsiyum içeriğinin artması ilişkilidir. İnsan kemiğinin

stokiyometrik Ca / P oranı 1,67 olarak rapor edilmiştir[114]. 1,67'lik orandan sapma sonucu kristal yapı bozulmaktadır. Bu da materyalin parçalanmasını hızlandırmaktadır[115]. Bu nedenle, 1,69'luk (Ca + Sr)/P oranına sahip HA5Sr ile karşılaştırıldığında, 1,62'lik (Ca + Sr)/P oranına sahip Sr10HA daha yüksek biyobozunur özelliktedir.

4.1.3. Hidroksiapatit (HA) ve Stronsiyum Hidroksiapatit (SrHA) Nanopartiküllerinin XRD Analizi

Hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit materyallerinin kristal yapısını aydınlatmak amacıyla XRD analizi yapılmıştır. XRD analizi sonrası HA, HA5Sr, HA10Sr ve HA15Sr materyallerine ait X ışını kırınım pikleri Şekil 4.6'da verilmiştir.





Şekil 4.6. (A) Hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit nanopartiküllerinin (HA5Sr, HA10Sr, HA15Sr) X-Işını Kırınım (XRD) desenleri (B) Standart nanohidroksiapatit (JCPDS No: 9-0432) X-Işını Kırınım (XRD) desenleri

Şekil 4.6.B'de gösterildiği gibi, sentezlenen hidroksiapatitin ana piklerinin standart nanohidroksiapatit[116] ile uyduğu görülmektedir. XRD analizine göre tüm yapıların

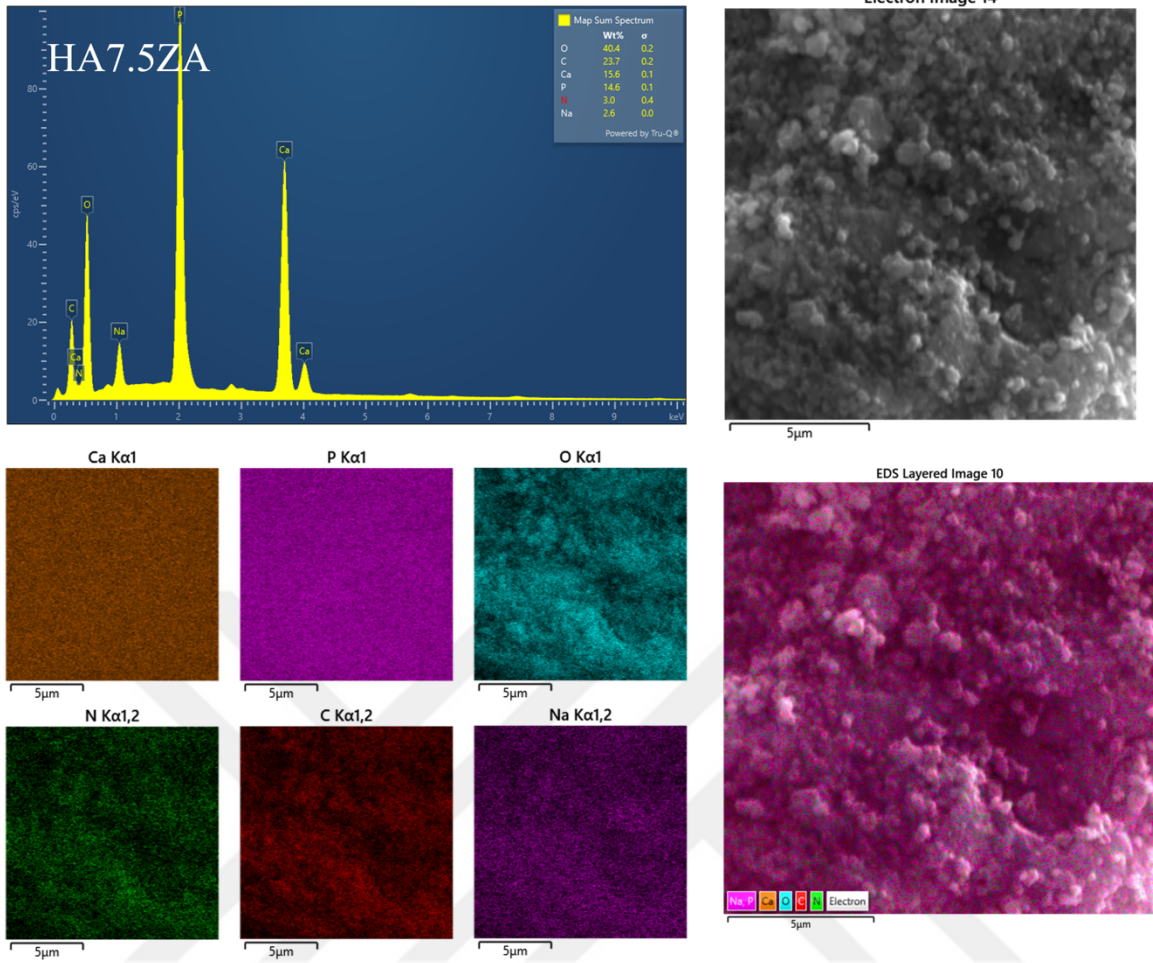
herhangi bir tespit edilebilir safsızlık fazı olmadan başarıyla sentezlendiği sonucuna varılmıştır. Düşük stronsiyum içeriğiyle kristal boyutunun ve kristalliliğinin azaldığı bildirilmiş olsa da %5, %10 ve %15 stronsiyum içeriği stronsiyum hidroksiapatit desenlerinde görünür önemli bir farka neden olmamıştır[117]. Ancak artan stronsiyum içeriğiyle daha gürültülü XRD spektrumları elde edilmiştir. Ayrıca stronsiyum miktarındaki artışın bir sonucu olarak, stronsiyum hidroksiapatit karakteristik piklerinin daha düşük 2θ değerine kaydığı görülmüştür. Bu durum stronsiyum hidroksiapatit yapılarının hidroksiapatite göre daha düşük kristallığe sahip olduğunu düşündürmektedir. Artan stronsiyum içeriği sonucunda apatit yapısı dengesizleşebilir ve kristal simetrisi bozulabilir[118] [119]. Hidroksiapatit yapısında kalsiyumun stronsiyumla değiştirilmesi fosfat ortamının bozulmasına neden olmaktadır. %1,5'ten az stronsiyum ilavesi kristaliniteyi, morfolojiyi ve kafes aralığını etkilememiş ancak kristal boyutunu hafifçe artırmıştır. Ancak %15 stronsiyum varlığı daha düşük kristalinite ve kafes aralığıyla sonuçlanmıştır[119]. Bu fark daha büyük atom yarıçapına sahip olan Ca^{2+} iyonlarının Sr^{2+} iyonlarıyla değiştirilmesinden kaynaklanmaktadır[120]. Bu, stronsiyumun kristal yapıya dahil edildiğini kanıtlamaktadır. Ek olarak, 600°C'lik kalsinasyon sıcaklığından sonra hidroksiapatit tozlarının herhangi bir ikincil faz olmaksızın saf hidroksiapatit fazına karşılık gelen kırınım pikleri gösterdiği bildirilmiştir. Kalsinasyon sıcaklığının bir sonucu olarak, hidroksiapatit kristallerinin daha fazla birleşmesi nedeniyle kristalinite artmaktadır[121].

4.2. Zoledronik Asit Modifiye Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Zoledronik asit modifiye hidroksiapatit ve stronsiyum hidroksiapatit nanopartiküller EDS ve XRD analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

4.2.1. Zoledronik Asit Modifiye Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin EDS Analizi

Zoledronik asit modifiye hidroksiapatit nanopartiküllerinin element içeriği EDS analizi ile belirlenmiştir. %7,5 (a/a) zoledronik asit ile modifiye edilmiş saf hidroksiapatit materyalin (HA7.5ZA) elementel içeriği ve EDS görüntü desenleri Şekil 4.7'de verilmiştir.



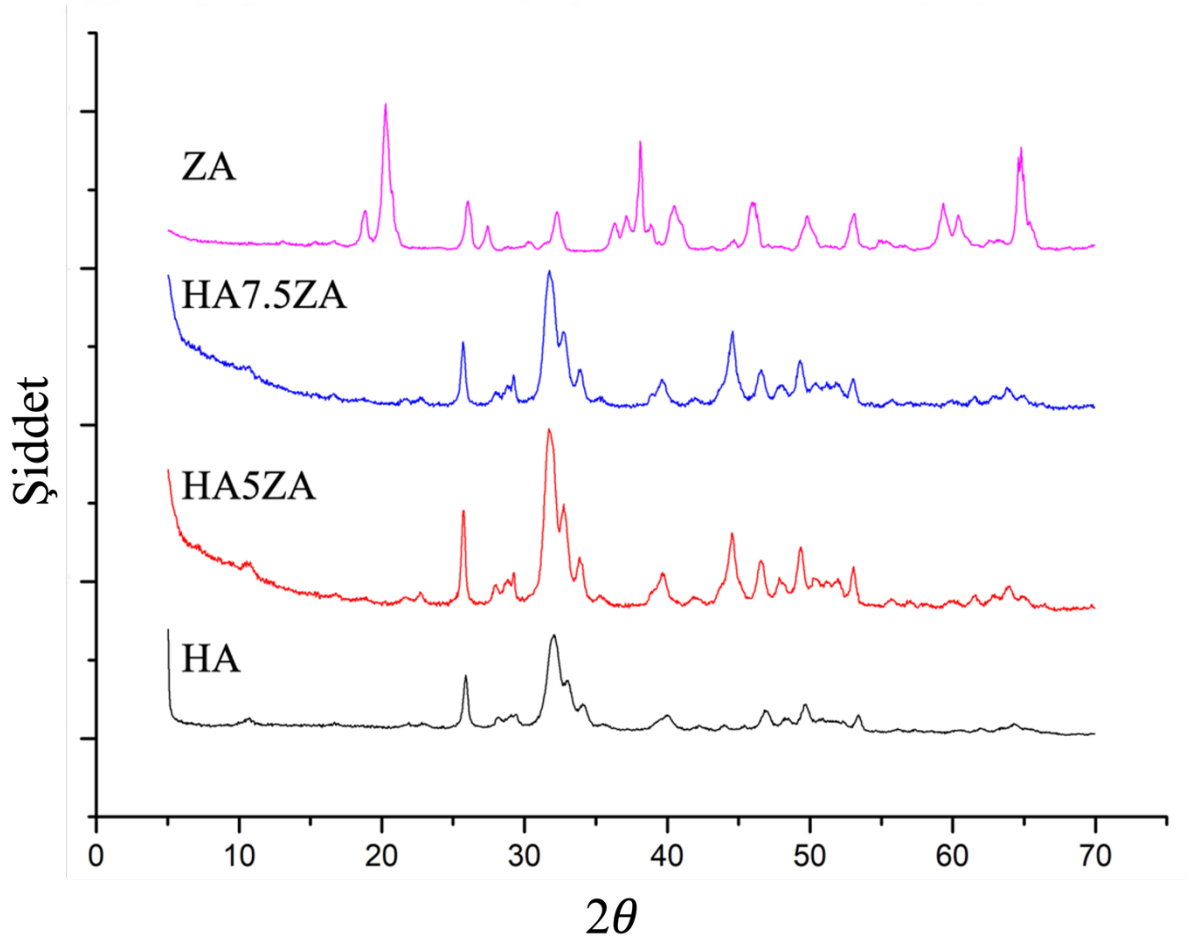
Şekil 4.7. Kütlece %7,5 zoledronik asit içeren hidroksiapatit (HA7,5ZA) materyalin elementel içeriği ve EDS görüntü desenleri

Zoledronik asit modifiye hidroksiapatit nanopartiküllerinin element içeriği EDS analizi ile belirlenmiştir. Analiz kütlece %7,5 oranında zoledronik asit modifiye hidroksiapatit numunesine aittir. EDS analizine göre numunenin element içeriği $40,4 \pm 0,2$ oksijen, $23,7 \pm 0,2$ karbon, $15,6 \pm 0,1$ kalsiyum, $14,6 \pm 0,1$ fosfor, $3,0 \pm 0,4$ azot ve $2,6 \pm 0,0$ sodyumdur. Numunedeki karbon ve azot içeriği zoledronik asit kökenlidir. Ancak analizden önce yapılan karbon kaplama işleminin karbon içeriğini artırmış olması muhtemeldir. Saf hidroksiapatitin azot içermemesi nedeniyle numunedeki azot içeriği tamamen zoledronik aside atfedilmektedir. Bu bağlamda zoledronik asidin hidroksiapatit nanopartiküllerinin yüzeyine başarılı bir şekilde adsorplandığı kanıtlanmıştır. Zoledronik asidin hidroksiapatit yüzeyindeki yüksek adsorpsiyonu, zoledronik asidin azot içeriğine bağlanabilir. Zoledronik asitteki azot, hidroksiapatit kristal yüzeyiyle etkileşime girme yeteneğine sahiptir[57] Ayrıca, zoledronik

asidin hidroksiapatit yapısına homojen entegrasyonu EDS desenleriyle kanıtlanmıştır. Karbon ve azot desenleri, kalsiyum, oksijen ve fosfor desenleriyle tamamen tutarlıdır.

4.2.2. Zoledronik Asit Modifiye Hidroksiapatit ve Stronsiyum Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin XRD Analizi

Farklı oranlarda zoledronik asit ile modifiye edilmiş hidroksiapatit nanopartiküllerin ve zoledronik asidin kristal yapısı XRD analizi ile incelenmiştir. Kütlece %5 ve %7,5 zoledronik asit ile modifiye edilmiş saf hidroksiapatit materyalin (HA5ZA, HA7.5ZA) XRD desenleri Şekil 4.8’de verilmiştir.



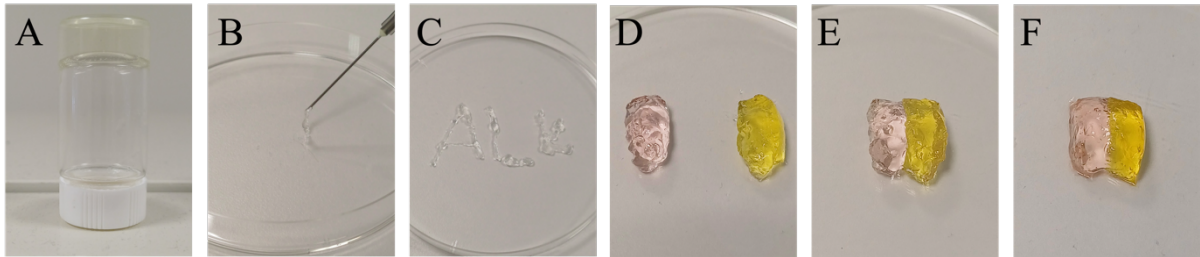
Şekil 4.8. Saf hidroksiapatit (HA), zoledronik asit (ZA), %5 ve %7,5 zoledronik asitle modifiye edilmiş saf hidroksiapatit nanopartiküllerin (HA5ZA, HA7,5ZA) X-Işını Kırınım (XRD) desenleri

Şekil 4.8’de Hidroksiapatit (HA), zoledronik asit (ZA), %5 zoledronik asit modifiye edilmiş hidroksiapatit (HA5ZA) ve %7,5 zoledronik asit modifiye edilmiş hidroksiapatit (HA7,5ZA) formülasyonlarının XRD spektrumlarını göstermektedir. 22,8° ve 25,6°deki pikler açıkça zoledronik asitin karakteristiğidir[122]. Zoledronik asit ve hidroksiapatit nanopartiküllerinin piklerine HA5ZA ve HA7,5ZA formülasyonlarının spektrumlarında rastlanmıştır. Zoledronik asitin karakteristik 62° civarındaki piki her iki modifiye edilmiş yapıda da görülmüştür. Pikin modifiye edilmiş yapılarda 40°’de keskinleşmesi, yapılarda zoledronik asit bulunmasına bağlanabilir. Benzer şekilde, 50°-55° aralığında gözlenen pikler zoledronik asit kökenlidir. Piklerin düşük yoğunluğu muhtemelen modifiye edilmiş yapılardaki düşük zoledronik asit içeriğinden kaynaklanmaktadır. Tüm veriler zoledronik asidin hidroksiapatit yapısına başarılı bir şekilde adsorbe edildiğini göstermektedir.

4.3. CMC/OD Hidrojellerin Karakterizasyonu

CMC/OD hidrojellerinin hazırlanması herhangi bir ek çapraz bağlayıcı madde eklenmeden gerçekleştirilmiştir. o-CMC’de bulunan amino grupları ile O-Dex’te bulunan aldehit grupları arasında gerçekleşen imin bağı reaksiyonu sonucu hidrojel oluşumu gözlenmiştir. Bu oluşum Schiff-baz reaksiyonuna atfedilmektedir. Bu kimyasal reaksiyon iki biyopolimer arasındaki etkileşimi teşvik ederek kararlı bir hidrojel ağının kurulmasına yol açmaktadır. Harici çapraz bağlayıcı maddelerin yokluğu sadece sentez sürecini basitleştirmekle kalmaz, aynı zamanda çeşitli uygulamalar için ortaya çıkan hidrojellerin biyoyumluluğunu ve işlevselliğini de potansiyel olarak artırır[123].

Schiff bazı reaksiyonu kimyasal olarak çapraz bağlı bir ağ ve şeffaf bir hidrojel oluşumuyla sonuçlanmıştır. Oluşan hidrojin görüntüsü Şekil 4.9’da verilmiştir.



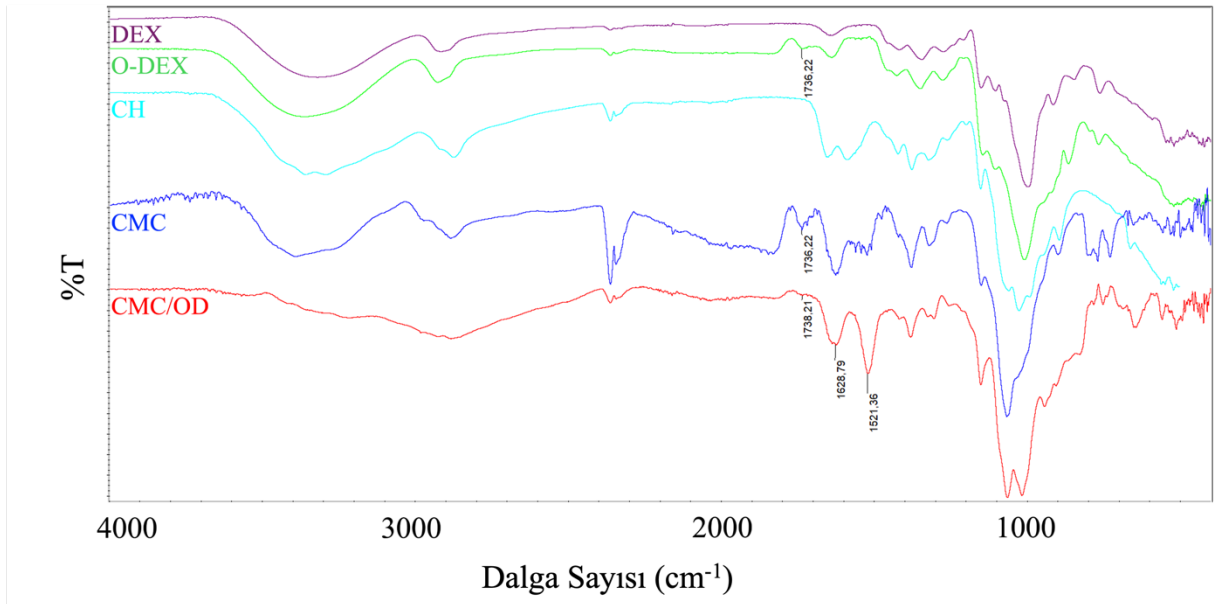
Şekil 4.9. A) CMC/OD hidrojel B) CMC/OD/HA hidrojinin enjekte edilebilirliği C) Enjekte edilmiş CMC/OD hidrojel D) Renkli CMC/OD hidrojellerinin kesilmiş görüntüsü E) Yeniden

birleştirilmiş CMC/OD hidrojenlerinin görüntüsü F) Kendini iyileştiren CMC/OD hidrojenlerinin görüntüsü

Şekil 4.9.B'de görüldüğü gibi hidroksiapatit nanopartikülleri içeren hidrojel enjekte edilebilir formdadır. Nanopartikülleri içeren hidrojel şırıngadan kolayca enjekte edilmiştir (Şekil 4.9.C). Ek olarak hidrojenlerin sahip olduğu kendi kendini iyileştirme mekanizması da ayrıca incelenmiş ve yorumlanmıştır. Renkli CMC/OD hidrojenleri iki yarıya kesilmiş (Şekil 4.9.D) ve daha sonra temas ettirilmiştir (Şekil 4.9.E). Oda sıcaklığında iki saat sonra hidrojel kendi kendini iyileştirmiştir (Şekil 4.9.F). İyileşmeden sonra, bağlantı noktasında fiziksel hasarın belirgin bir izi görülmemiştir. Kendi kendini iyileştirme mekanizması, O-Dex'in tepkimeye girmemiş aldehit grupları ile CMC'nın amino grupları arasındaki Schiff bazının dinamik bağlanmasına dayanmaktadır[124].

4.3.1. CMC/OD Hidrojenlerin FTIR Analizi

Kitosanın karboksilasyonu, dekstran oksidasyonu ve sentezlenen Schiff bazı CMC/OD hidrojeninin FTIR spektrumları Şekil 4.10'da görülmektedir.



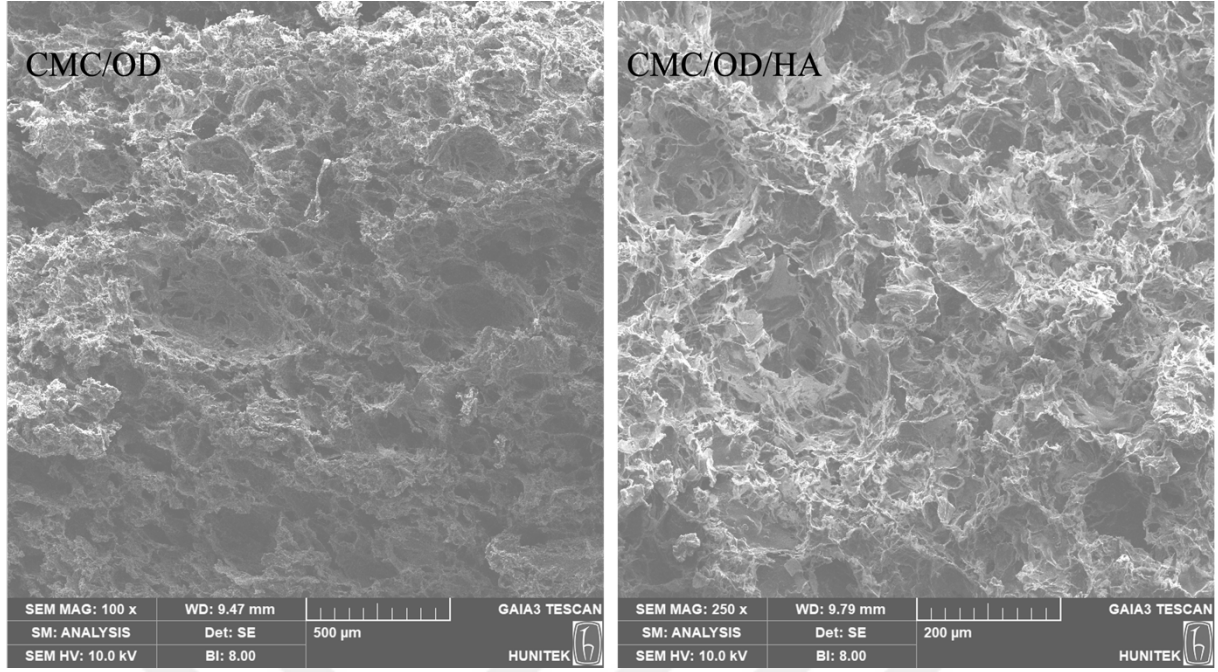
Şekil 4.10. Dekstan (Dex), oksitlenmiş dekstran (O-Dex), kitosan (CH), karboksimetil kitosan (CMC) ve karboksimetil kitosan/oksitlenmiş dekstran (CMC/OD) hidrojele ait FTIR spektrumu

Dekstranın oksidasyonu polimerik zincir boyunca çoklu aldehit gruplarının oluşumuyla

sonuçlanmıştır. O-Dex FTIR spektrumunda 1736 cm^{-1} 'deki karakteristik bağ, aldehit yapısındaki karbonil grubu gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. Bu karakteristik bağ dekstran oksidasyonunun kanıtıdır[125]. Karbonil grubunun nispeten yüksek frekansı muhtemelen yapıdaki hidrojen bağlarının varlığıyla ilişkilidir. Kitosanın ana karakteristik tepeleri 3455 cm^{-1} (O-H gerilmesi), $2923\text{-}2867\text{ cm}^{-1}$ (C-H gerilmesi) ve 1600 cm^{-1} 'dir (N-H bükülmesi)[72]. CMC, -COO- grubuna özgü 1620 cm^{-1} bölgesinde daha yoğun FTIR adsorpsiyon bantları sunmaktadır. Bu, CMC için daha önce yayınlanmış bilimsel sonuçlarla uyumludur[126]. -NH_2 ve -OH gruplarına özgü 3440 cm^{-1} civarındaki emilim bantlarının ve -CH_2 grubuna özgü 2920 cm^{-1} civarındaki bir bandın varlığı, kitosanın temel kimyasal yapısının sentez sırasında değişmediğini ve -NH_2 grubu ikamesinin kısmi olduğunu doğrulamaktadır[127]. Monokloroasetik asitten önce, sodyum, kitosanın sert kristal kesitlerini genişleterek polimer zincir katmanları arasındaki etkileşimi kırmıştır. Sonuç olarak, monokloroasetik asit, kitosanın polimer zincirini daha kolay dağıtmıştır[72]. o-CMC'nin amino grupları ile O-Dex'in aldehit grupları arasında, imin bağları oluşturmak için çapraz bağlanma reaksiyonu meydana geldiği bilinmektedir. Bu reaksiyon FTIR spektrumunda 1628 cm^{-1} 'de imin karakteristik bandının ortaya çıkmasıyla doğrulanmıştır. 1738 cm^{-1} 'de aldehit gruplarının pik yoğunluğunun azalması da imin bağının kanıtıdır[125]. Bu azalma aldehit gruplarının amin gruplarıyla reaksiyona girerek imin bağları oluşturmaktan kaynaklanmaktadır. İmin grubunun nispeten düşük frekansı yapıda -OH , -NH_2 gibi elektron verici grupların varlığı, amin grubu etrafındaki sterik etkiler ve çapraz bağlanma ile ilişkilendirilebilir. Tüm bu olasılıklar imin bağını zayıflatabilir ve frekansın daha düşük bir değere kaymasına neden olabilir. Ayrıca, sentezlenen o-CMC'deki karboksil içeriği %21,3 ve O-Dex'teki oksidasyon derecesi %28,8 olarak hesaplanmıştır.

4.3.2. CMC/OD Hidrojellerin SEM Analizi

Dondurularak kurutulmuş karboksimetil kitosan/oksitlenmiş dekstran hidrojel (CMC/OD) ve hidroksiapatit nanopartikül içeren karboksimetil kitosan/oksitlenmiş dekstran hidrojellerin (CMC/OD/HA) morfolojisini belirlemek için SEM analizi yapılmıştır. CMC/OD ve CMC/OD/HA hidrojellerinin SEM görüntüleri Şekil 4.11'de verilmiştir.

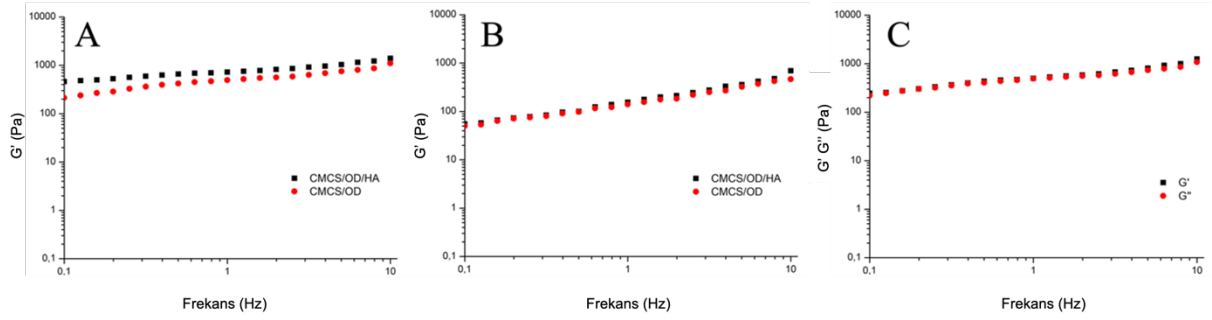


Şekil 4.11. CMC/OD ve hidroksiapatit nanopartikül içeren CMC/OD/HA hidrojelinin 100x ve 250x büyütmedeki SEM görüntüleri

Parçacıkların varlığı hidrojel morfolojisinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Her iki örnek de üç boyutlu gözenekli bir yapı göstermektedir. Bu gözenekli yapı liyofilizasyon işlemi sırasında hidrojelden uzaklaştırılan buz kristallerinden kaynaklanmaktadır. Her iki yapıda bulunan birbirine bağlı mikro gözeneklerin hücre kültür çalışmalarında hücre tutunması ve hücre iletişimi için daha fazla alan sağlaması beklenmektedir[128].

4.3.3. CMC/OD Hidrojellerin Reolojik Analizi

Viskoelastik özellikler, polimerik hidrojellerin mekanik mukavemetini belirlemede kritik bir parametredir[129]. Hidroksiapatit içeren CMC/OD/HA hidrojel, CMC/OD hidrojel ve kendini iyileştirmiş CMC/OD hidrojel örneklerinin viskoelastik özellikleri, elastik modül (G') ve kayıp modül (G'') değişimlerinin izlenmesiyle değerlendirilmiştir. CMC/OD/HA hidrojel, CMC/OD ve kendini iyileştirmiş CMC/OD hidrojelinin karşılaştırmalı reolojik grafikleri Şekil 4.12’de sunulmuştur.

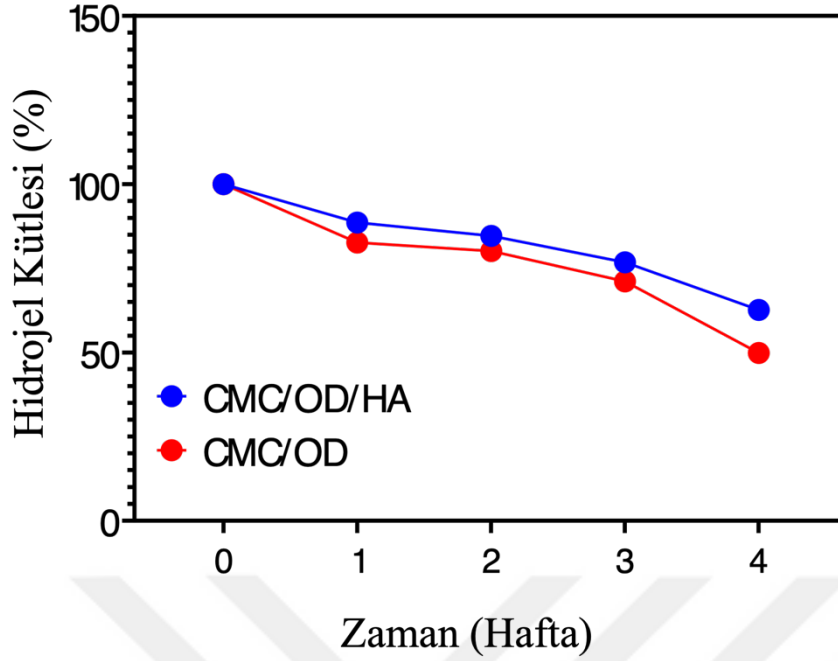


Şekil 4.12. A) CMC/OD ve CMC/OD/HA hidrojenlerinin karşılaştırmalı G' değerleri B) CMC/OD ve CMC/OD/HA hidrojenlerinin karşılaştırmalı G'' değerleri C) Kendi kendini iyileştiren CMC/OD hidrojeninin karşılaştırmalı G' ve G'' değerleri

Hidroksiapatit nanopartikül içeren ve HA nanopartikül içermeyen her iki numunenin G' değerlerinin başlangıç aşamasından itibaren G'' değerinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu özellik muhtemelen hızlı jelleşme süreçlerinden kaynaklanmaktadır[130] [131] [132]. Hidroksiapatit nanopartiküller içeren CMC/OD/HA hidrojeninin yaklaşık 1400 Pa'lık yüksek G' değeri hidrojenin sertliğini yansıtmaktadır. CMC/OD hidrojeninin G' değeri, hidroksiapatit nanopartikül içermemesi nedeniyle daha düşük sertliğe sahiptir. Hidrojel iskeleti nispeten zayıftır ve bu nedenle kullanımı gerilim taşımayan kemiğin yeniden yapılandırılmasıyla sınırlıdır[133]. Ek olarak hidrojenlerin kendi kendini iyileştirme yeteneğini açıklığa kavuşturmak için yapılan reolojik test sonuçları Şekil 4.12.C'de gösterilmiştir. Beklendiği üzere kendi kendini iyileştiren CMC/OD hidrojeninin G' ve G'' değerlerinde bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak orijinal ve iyileştirilmiş hidrojenlerin yakın elastik modül değerleri, elastik özelliklerin iyileşmeden sonra büyük ölçüde geri kazanıldığını göstermektedir.

4.3.4. CMC/OD Hidrojenlerin Degradasyon Analizi

Hidroksiapatit nanopartikül içeren (CMC/OD/HA) ve hidroksiapatit nanopartikül içermeyen (CMC/OD) hidrojel gruplarının dört haftalık süreçteki degradasyon sonuçları Şekil 4.13'te verilmiştir.



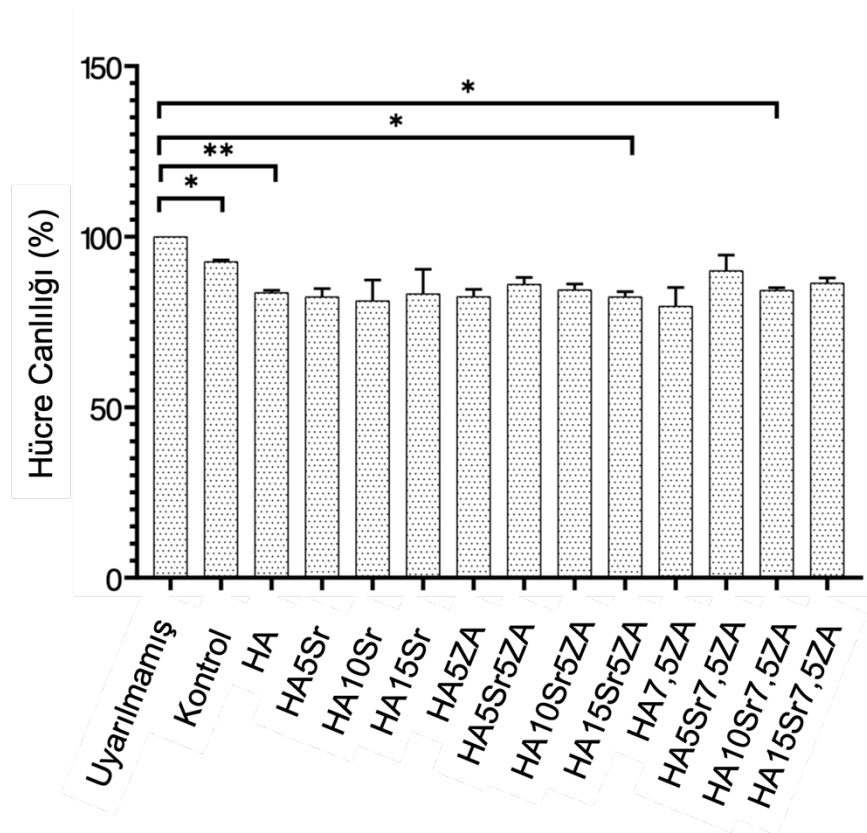
Şekil 4.13. CMC/OD ve CMC/OD/HA hidrojellerinin degradasyonu

CMC/OD hidrojel ve hidroksiapatit nanopartikülleri içeren CMC/OD/HA hidrojelinin in vitro bozunma hızı 37°C'de PBS çözeltisinde (0,01 M, pH = 7,4) incelenmiştir. Şekil 4.13'te görüldüğü gibi, hidrojeller başlangıç aşamasında çok yavaş bir bozunma profili göstermiştir. Ağırlık kaybı yapıdaki imin bağlarının hidrolizi sonucu oluşmaktadır. İki hafta sonunda yaklaşık %15 kütle kaybı gözlenmiştir. Düşük bozunma güçlü bir şekilde çapraz bağlı CMC ve O-Dex zincirlerinin kolayca çözünmemesinden kaynaklanmaktadır. Sonraki haftalarda hidrojeller nispeten hızlı bir bozunma profili göstermiştir. Hızlı bozunma profili CMC ve O-Dex zincirleri arasındaki Schiff bazı bağlarının kademeli hidrolizinden kaynaklanıyor olabilir[134]. İmin bağlarının kopması, hidrojin toplu bozunmasını kolaylaştırmış ve daha gevşek bir ağ yapısı da hidrojin daha hızlı bozunmasına yol açmıştır[128]. Hidroksiapatit nanopartikülleri içeren CMC/OD/HA hidrojin daha düşük bozunma profili muhtemelen nanohibrit hidrojin daha yüksek çapraz bağ içeriğinden kaynaklanmaktadır[135]. Hidroksiapatitin jel oluşturma sistemine dahil edilmesi hidrojel iskelelerinin kararlılığını önemli ölçüde artırmaktadır. Nanohidroksiapatitin kullanımı hidrojel matrisi içindeki çapraz bağlama yoğunluğunu artırmaktadır. Ek olarak, nanohidroksiapatitin varlığı yapıya dayanıklılık kazandırdığı için daha yavaş bir kütle kaybı görülmüştür. Hidroksiapatitin entegrasyonu hidrojel iskelelerinin biyomühendislik uygulamalarındaki performansında önemli rol oynamaktadır[128].

4.4. Zoledronik Asit Yüklü Hidrojellerin *In Vitro* Sitouyumluluğu ve Osteojenik İndüksiyonu

4.4.1. MTT Testi

Farklı stronsiyum ve zoledronik asit yüklü hidroksiapatit nanopartikül içeren CMC/OD hidrojel formülasyonlarının MC3T3-E1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi ile incelenmiştir. Hücre canlılığı grafiği Şekil 4.14’de verilmiştir.



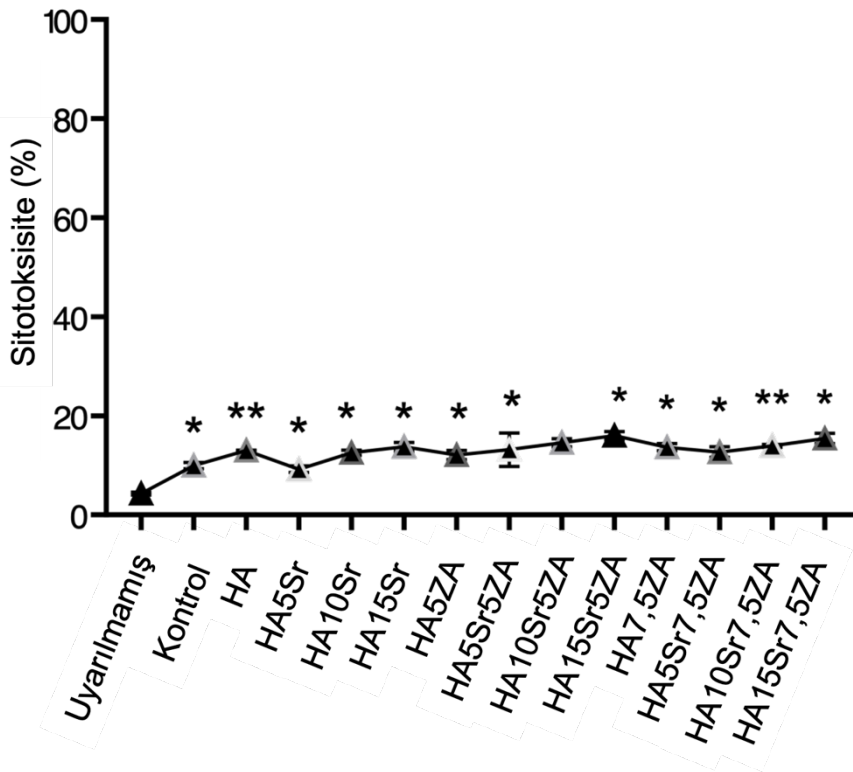
Şekil 4.14. CMC/HA hidrojellerinden elde edilen ekstraktlarla 24 saat uyarıldıktan sonra hücrelerde MTT sonuçları. Birden fazla grubu karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA gerçekleştirilmiş ve Bonferroni post hoc testi uygulanmıştır. n:3, p>0,05 (ns), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. Kontrol: Hidroksiapatit nanopartikül içermeyen CMC/OD hidrojel.

MTT sonuçlarına göre hidrojel gruplarının %80'in üzerinde canlılık gösterdiği gözlenmektedir. Kemiğin inorganik fazı olan hidroksiapatitin yüksek canlılık ve düşük toksisite göstermesi

beklenmektedir. Artan miktarlarda stronsiyum ilavesinin hidroksiapatit yapısında herhangi bir toksisiteye neden olmadığı, düşük seviyelerde stronsiyum ilavesinin ise hücre canlılığını artırdığı bildirilmiştir[136] [137]. Bulgular, %5 stronsiyum içeren hidroksiapatit gruplarının saf hidroksiapatit gruplarına kıyasla daha yüksek canlılık ve daha düşük toksisite gösterdiği göz önüne alındığında önceki araştırmalarla uyumludur[138]. Ayrıca, saf hidroksiapatit materyaldeki düşük miktarda zoledronik asit içeriğinin toksisiteye neden olmadığı açıklanmıştır[139] [57].

4.4.2. LDH Testi

Farklı stronsiyum ve zoledronik asit yüklü hidroksiapatit nanopartikül içeren CMC/OD hidrojel formülasyonlarının MC3T3-E1 sitotoksitesi üzerindeki etkisi LDH testi ile incelenmiştir. Farklı hidrojel formülasyonlarına ait LDH test sonuçları Şekil 4.15'te verilmektedir.

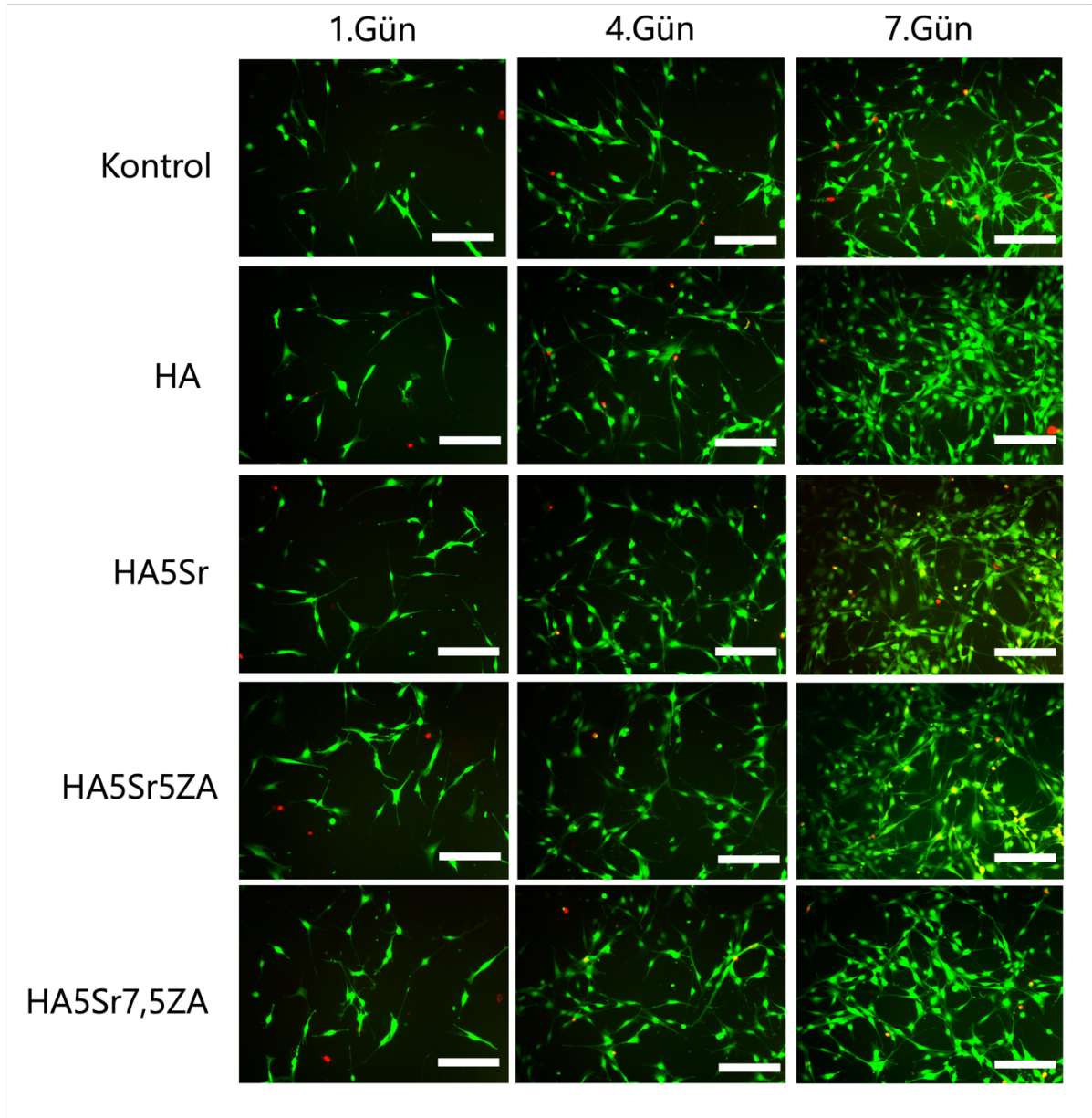


Şekil 4.15. CMC/HA hidrojellerinden elde edilen ekstraktlarla 24 saat uyarıldıktan sonra hücrelerde LDH sonuçları. Kontrol: Hidroksiapatit nanopartikül içermeyen CMC/OD hidrojel.

LDH sonuçlarına göre, tüm hidrojel gruplarında %16'nın altında nekrotik etki görülmüştür. Sitotoksik olmayan biyomalzemelerin %70'in üzerinde hücre canlılığına sahip olduğu belirtilmiştir[140] [141]. Bu sonuçlar hidrojellerin sitotoksik olmayan doğasını doğrulamaktadır. Hafif nekrotik etki CMC yapısının asidik bir ortam yaratma eğilimine bağlanabilir. CMC yapısındaki karboksimetil grupları proton verebilen asidik gruplardır. Asidik koşullar hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açabilir ve bu da hücre canlılığını azaltabilir[142] [143]. Bulgular, stronsiyum ve zoledronik asidin eş zamanlı varlığının hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Hücre canlılığı ve sitotoksikite deneyleri göz önüne alındığında, %5 stronsiyum içeren stronsiyum ve zoledronik asit hidrojelleri optimum performans göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, HA, HA5Sr, HA5Sr5ZA ve HA5Sr7,5ZA gruplarıyla deneylere devam edilmiştir.

4.4.3. Canlı/Ölü Hücre Boyama Testi

Zoledronik asit yüklü stronsiyum hidroksiapatit nanopartikül içeren hidrojeller üzerindeki hücrelerin sitokompatibilitesi ve osteogenik indüksiyonu 1, 4 ve 7 gün boyunca EtBr/Kalsein AM floresansı kullanılarak incelenmiştir. 1, 4 ve 7 günlük EtBr/Calcein AM floresansı Şekil 4.16'da verilmiştir.



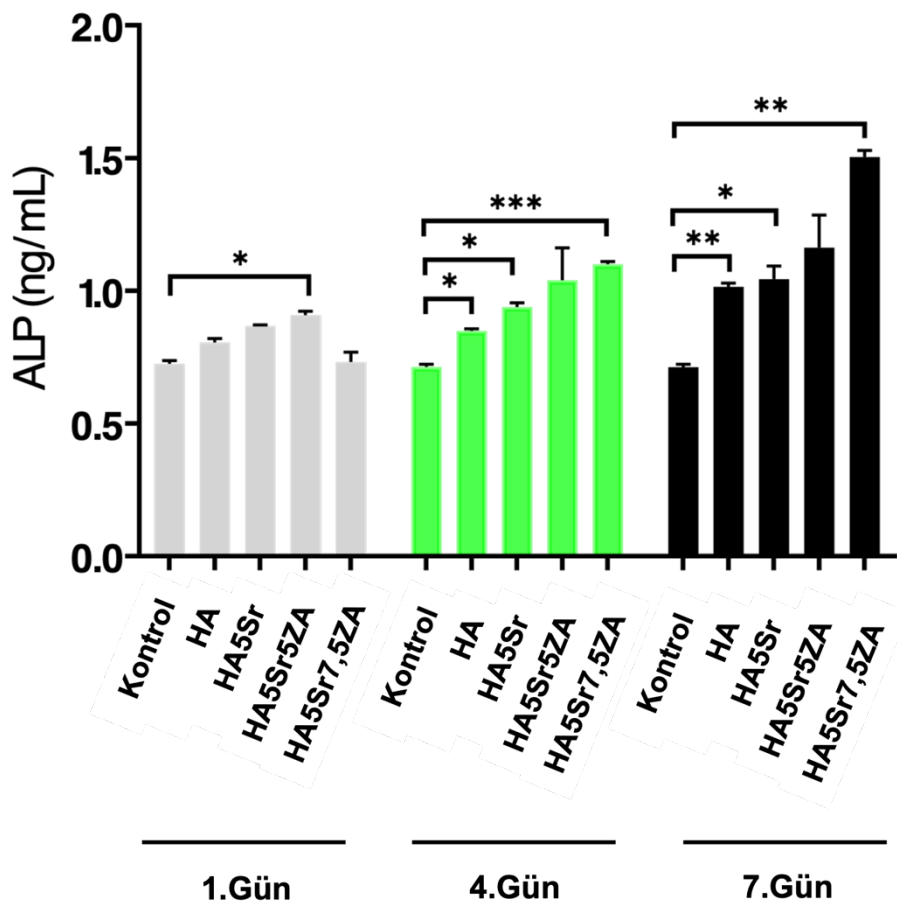
Şekil 4.16. 1, 4 ve 7 günlük EtBr/Calcein AM floresans görüntüsü. Floresan görüntülerdeki ölçek çubuğu 125 µm'yi temsil etmektedir.

Tüm gruptaki canlı osteoblast hücreleri yeşil floresans göstermektedir. Bu da neredeyse tüm canlı hücrelerin Kalsein AM boyasıyla boyandığını düşündürmektedir. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, zoledronik asit yüklü gruptaki osteoblast hücreleri 1, 4 ve 7. günlerde kademeli olarak çoğalmıştır. Bu da stronsiyum ve zoledronik asit yüklü hidrojel in iyi biyouyumluluğa sahip olduğunu göstermektedir. Ek olarak, özellikle stronsiyum ve zoledronik asit içeren grupta iğ benzeri yapılar gözlenmiştir. Yüksek gözeneklilik ve yüzey alanına sahip CMC/OD hidrojel gruplarının sınırlı canlı hücre içeriği, düşük stronsiyum ve zoledronik asit varlığından

kaynaklanabilir.

4.4.4. Alkalen Fosfataz (ALP) Testi

Zoledronik asit yüklü stronsiyum hidroksiapatit nanopartikül içeren hidrojeller üzerindeki hücrelerin 1, 4 ve 7 günlük alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi spektrofotometrik olarak incelenmiştir. 1, 4 ve 7 gün boyunca çeşitli stronsiyum ve zoledronik asit yüklü CMC/OD hidrojel formülasyonlarındaki hücrelerdeki ALP aktivitesi Şekil 4.17’de verilmiştir.



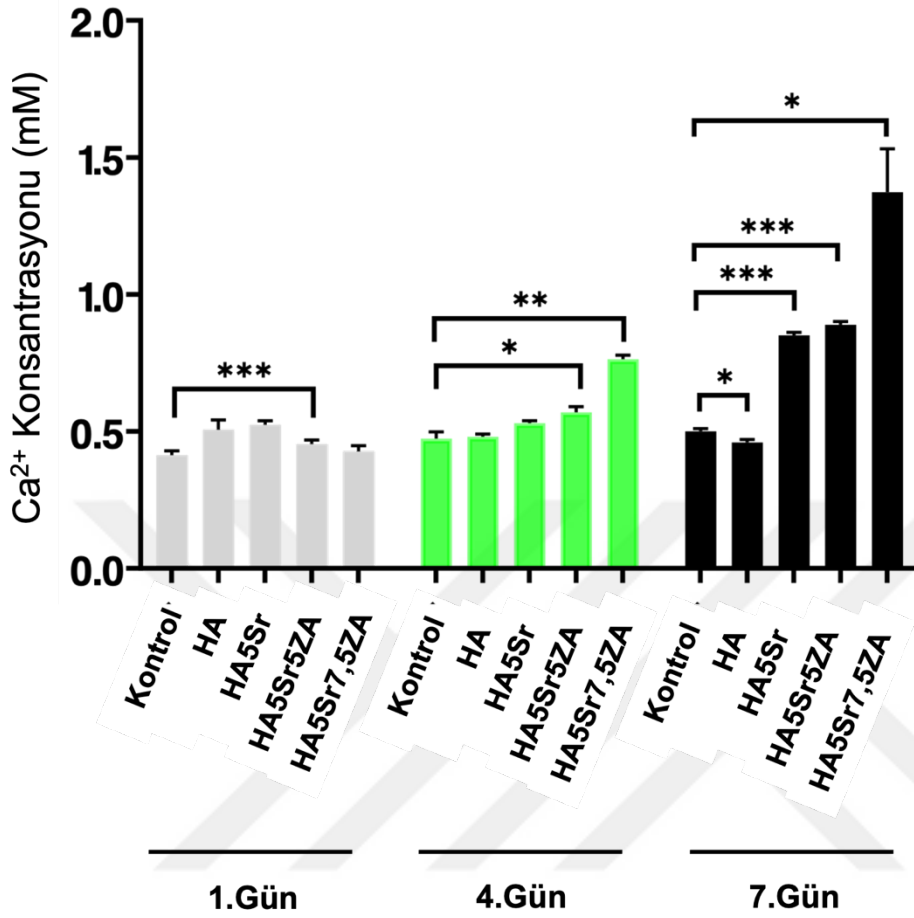
Şekil 4.17. 1, 4 ve 7 gün boyunca çeşitli stronsiyum ve zoledronik asit yüklü CMC/OD hidrojel formülasyonlarındaki hücrelerdeki ALP aktivitesi. Birden fazla grubu karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA gerçekleştirilmiş ve Bonferroni post hoc testi uygulanmıştır. n:3, p>0,05 (ns), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. Kontrol: Hidroksiapatit nanopartikül içermeyen CMC/OD hidrojel.

Şekil 4.17’de görüldüğü gibi, HA5Sr5ZA ve HA5Sr7,5ZA gruplarındaki ALP aktivitesi

kontrol, HA ve HA5Sr gruplarındakinden önemli ölçüde daha yüksektir. Stronsiyum ve zoledronik asit içeren hidrojin (HA5Sr5ZA) ALP aktivitesi, 1 gün boyunca kontrol grubundan önemli ölçüde daha yüksektir ($p<0,05$). Dört günlük kültürden sonra, HA5Sr ve HA5Sr7,5ZA hidrojenleri, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha yüksek ALP aktivasyonu göstermiştir (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,001$). Kontrol grubu, HA5Sr ve HA5Sr7,5ZA arasında 7 gün sonunda belirgin bir fark vardır. ALP aktivasyon seviyesi, HA5Sr7,5ZA örneğinde diğer gruplara kıyasla en yüksektir. Stronsiyum ve zoledronik asit içeren materyal, kontrol grubundan anlamlı şekilde daha yüksek ALP aktivitesi vermiştir ($p<0,05$). Zoledronik asit varlığındaki ALP aktivitesinde kültürün 7. gününde anlamlı bir artış kaydedilmiştir[57]. Hem stronsiyum hem de zoledronik asidin osteoblast proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkilediği bildirilmiştir[144] [93] [145] [146] [57]). Zoledronik asitin osteoblastlar üzerindeki etkileri zoledronik asit dozuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir[147]. Düşük konsantrasyonda ve stronsiyum ile kombinasyon halinde zoledronik asit sitotoksisite göstermedi. Ayrıca, hücre dışı matris birikimi üzerinde pozitif bir etki göstermektedir. Mevcut çalışmanın sonuçları daha önce rapor edilenler ile tutarlıdır [57] [58] [148].

4.4.5. Kalsiyum Birikim Analizi

Zoledronik asit yüklü stronsiyum hidroksiapatit nanopartikül içeren hidrojenler üzerindeki hücrelerin 1, 4 ve 7 günlük kalsiyum birikim analizi spektrofotometrik olarak incelenmiştir. 1, 4 ve 7 gün boyunca çeşitli stronsiyum ve zoledronik asit yüklü CMC/OD hidrojel formülasyonlarındaki hücrelerdeki Ca^{2+} birikimi Şekil 4.18'de verilmiştir.



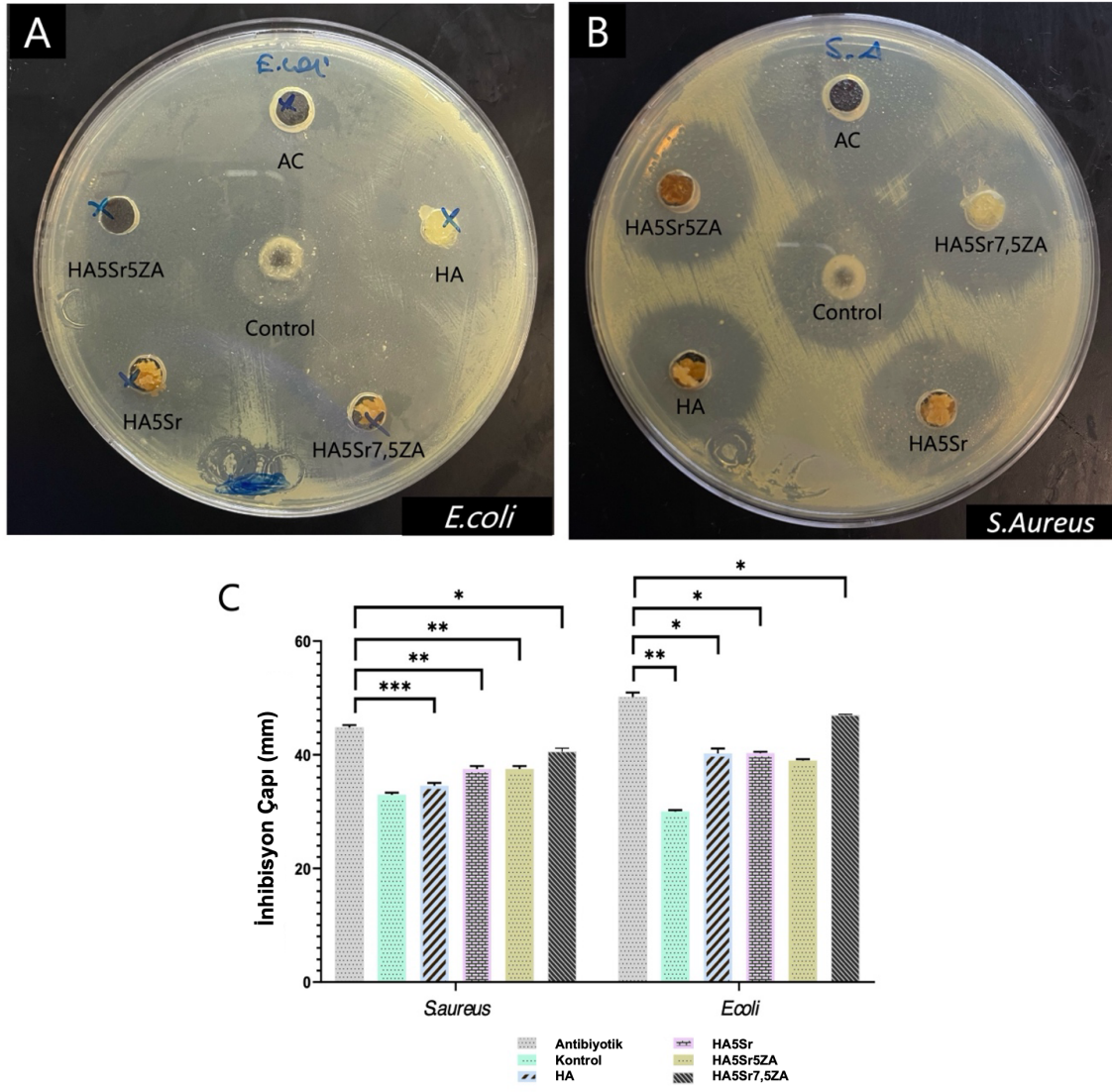
Şekil 4.18. 1, 4 ve 7 gün boyunca çeşitli stronsiyum ve zoledronik asit yüklü CMC/OD hidrojel formülasyonlarındaki hücrelerdeki Ca²⁺ birikimi. Birden fazla grubu karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA gerçekleştirilmiş ve Bonferroni post hoc testi uygulanmıştır. n:3, p>0,05 (ns), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. Kontrol: Hidroksiapatit nanopartikül içermeyen CMC/OD hidrojel.

Hücre içi kalsiyum birikimi osteojenik farklılaşmanın önemli bir özelliğidir. Stronsiyum ve zoledronik asit yüklü hidroksiapatit nanopartikül içeren hidrojel üzerindeki hücreler (HA5Sr5ZA), 1 gün sonra kontrol grubundan önemli ölçüde daha yüksek kalsiyum birikimi göstermiştir (p<0,001). HA5Sr7,5ZA hidrojeli, 4 ve 7 gün sonra kontrol grubundan önemli ölçüde daha yüksek kalsiyum birikimi göstermiştir (p<0,05). Stronsiyum içeren HA5Sr, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 7 günlük kültürden sonra kalsiyum mineralizasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (p<0,001). Kalsiyum birikimi ile hücre çoğalması arasında bir korelasyon olabilir. Bulgular, hidroksiapatit seramik yapısına %5 ile

%10 stronsiyum eklenmesinin hücre çoğalmasını ve mineralleşmesini artırabileceğini göstermektedir[149] [144]. Dahası, zoledronik asit varlığının saf hidroksiapatite kıyasla osteoblast çoğalmasını artırdığı gösterilmiştir[57]. CMC/OD hidrojelinin gözenekli yapısı, hücrelerin çevre ile etkileşiminin artmasını sağlamıştır. Bu gözenekli yapı, hidroksiapatit parçacıklarının yapıya entegre edilmesiyle daha dayanıklı ve esnek hale gelerek kemik dokusunun doğal yük taşıma ve esneklik özelliklerini taklit edebilir.

4.4.6. Antibakteriyel Aktivite

Bakteriyel enfeksiyon doku rejenerasyonunu geciktirmekte ve yara iyileşmesini büyük ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, antibakteriyel özelliklere sahip hidrojellerin geliştirilmesi klinik uygulamada büyük öneme sahiptir[150] [151]. Zoledronik asit yüklü stronsiyum hidroksiapatit nanopartikül içeren hidrojeller antibakteriyel aktiviteleri gram negatif *Escherichia Coli* ve gram pozitif *Staphylococcus Aureus* ile değerlendirilmiştir. Stronsiyum ve zoledronik asit yüklü CMC/OD hidrojellerinin çeşitli formülasyonlarının *E. Coli* ve *S. Aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. Stronsiyum ve zoledronik asit yüklü CMC/OD hidrojellerinin çeşitli formülasyonlarının *E. Coli* (A) ve *S. Aureus*'a (B) karşı antibakteriyel aktivitesi. Birden fazla grubu karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA gerçekleştirilmiş ve Bonferroni post hoc testi uygulanmıştır. n:3, $p>0,05$ (ns), $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$; $****p<0,0001$. Kontrol: Hidroksiapatit nanopartikül içermeyen CMC/OD hidrojel.

Hidrojellerin plakalardaki inhibisyon alanı doğrudan kontrol antibiyotiğiyle (50 $\mu\text{g/mL}$) karşılaştırılmış ve CMC/OD hidrojellerinin hem *E. coli* hem de *S. aureus*'un büyümesini engellediği açıkça görülmüştür. Agar disk difüzyon testinin sonuçlarına göre, hidrojellerin *E. coli* ve *S. aureus*'a inhibitör etkisi saptanmıştır. Ayrıca, hidrojellerin *E. coli* üzerinde yüksek inhibitör etki vermiştir. Antibakteriyel aktivite testinde CMC/OD (Kontrol) grubu da antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bu nedenle antibakteriyel aktivitenin esas olarak CMC ve O-Dex'ten kaynaklandığı düşünülmektedir. Kitosanın amino grubu, bakterilerin yüzey

bileşenlerine bağlanarak ve büyümelerini engelleyerek bir antibakteriyel aktivite mekanizması geliştirmiştir. Kitosan negatif yüklü bakteri yüzeyine bağlanarak hücre zarını bozabilir. Yüksek konsantrasyonlarda ise kitosanın bakteri yüzeyini kapladığı ve hücre bariyeri boyunca kütle transferini önlediği düşünülmektedir[152]. Kitosanın antibakteriyel aktivitesi polimerde bulunan $-NH_2$ konsantrasyonu ile ilişkilidir. $-NH_2$ içeriğinin artmasıyla antibakteriyel özelliklerin arttığı belirtilmiştir. Çözelti ortamında kitosan çok sayıda $-NH_3$ içeriğine sahiptir. Bu nedenle kitosanın ve karboksimetillenmiş türevlerin antibakteriyel aktiviteleri de etkili $-NH_3$ gruplarının sayısına bağlıdır[153].

o-CMC ve kitosanın yapısında eşit sayıda $-NH_2$ grubu vardır. Ancak o-CMC yapısındaki $-COOH$ grubu $-NH_2$ ve yüklü amin gruplarıyla moleküller arası reaksiyona girmiş olabilir. Aynı koşullar altında o-CMC, kitosandan daha fazla $-NH_3$ grubuna sahip olması nedeniyle o-CMC'nin antibakteriyel aktivitesi daha yüksektir[153]. Kitosanın ve o-CMC nanopartiküllerinin g-pozitif *S. aureus*'a karşı antibakteriyel özellikleri deneysel olarak gösterilmiştir. Benzer şekilde o-CMC nanopartiküller kitosan nanopartiküllerinden daha yüksektir aktivite göstermektedir[154]. O-Dex'in antibakteriyel aktivitesi muhtemelen hücre zarlarında bulunan proteinlerdeki aldehit gruplarının amino gruplarıyla reaksiyonundan kaynaklanmaktadır[155]. O-Dex'in inhibe edici aktivitesi bakteri hücre duvarı üzerindeki görünür etki ve sitoplazmik içeriklerin kaybı ile açıklanmaktadır. Ek olarak, O-Dex'in hareketliliği ve kemotaksisi inhibe ettiği gösterilmiştir[156]. Stronsiyum ikamesinin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktiviteyi artırabileceği bildirilmiştir. Büyüme ve üreme, hücre metabolizması gibi aktiviteler Sr^{2+} iyonlarının salınmasıyla inhibe edilebilir[157] [158]. Ek olarak, bazı bisfosfonatların bakterilere karşı etkili olduğu bildirilmiştir[159]. Ayrıca, zoledronik asit içeren kitosan nanohidroksiapatit iskelelerinde kitosan nanohidroksiapatit iskelelerine kıyasla *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir[96]. Sonuç olarak, tüm grupların yüksek antibakteriyel etkisi kitosan, dekstran ve stronsiyum gibi antibakteriyel ajanların kombine kullanımına atfedilebilir.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında, Saf hidroksiapatit (HA) ve stronsiyum destekli hidroksiapatit (SrHA) materyallerini sentezlenmiş ve tüm materyalleri karakterize edilmiştir. Ardından geliştirilen stronsiyum destekli hidroksiapatit (SrHA) ve saf hidroksiapatit (HA) materyalleri 3. nesil bisfosfonat olan zoledronik asit ile modifiye edilmiş ve geliştirilen nanopartiküller

karakterize edilmiştir. Sentezlenen stronsiyum destekli zoledronik asit modifiye hidroksiapatit nanopartikülleri içeren enjekte edilebilir karboksimetil kitosan/oksitlenmiş dekstran hidrojel geliştirilmiş ve geliştirilen tüm hidrojel yapılarını fizikokimyasal açıdan karakterize edilmiştir. Stronsiyum destekli zoledronik asit modifiye hidroksiapatit nanopartikül içeren hidrojellerin *in vitro* özelliklerini incelemek amacıyla hücre kültür çalışmaları yapılmış ve stronsiyum destekli zoledronik asit modifiye hidroksiapatit nanopartikül içeren hidrojellerin kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanım potansiyeli tartışılmıştır.

Mevcut çalışmada, farklı stronsiyum ve zoledronik asit katkılı hidroksiapatit nanopartikülleri sentezlenmiş ve daha sonra bir hidrojel yapısı oluşturmak için CMC/OD ağlarına dahil edilmiştir. Tez, nHA/Sr/ZA/CMC/OD yapıları kullanılarak kemik defektlerinin rekonstrüksiyonuna ilişkin yeni ve orijinal bir raporu temsil etmektedir. Hidrojel, enjekte edilebilirlik, kendi kendini iyileştirme, antibakteriyel özellikler, gözenekli yapı ve uygun bozunma oranı göstermiştir. Dahası, düşük zoledronik asit içeriğine sahip hidrojel, ALP ve kalsiyum birikimi açısından yüksek aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, stronsiyum hidroksiapatitin zoledronik asit modifiye formunu içeren kompozit malzeme CMC/OD, ortopedi ve kraniyofasiyal cerrahi alanlarında çeşitli uygulamalar için önemli bir potansiyel göstermektedir. Bu yenilikçi malzeme, minimal invaziv prosedürlere ve hedeflenen bölgelere hassas bir şekilde iletilmesine olanak tanıyan enjekte edilebilirlik gibi üstün özelliklere sahiptir. Ek olarak, bu kompozitin antibakteriyel aktivitesi, cerrahi müdahalelerde yaygın bir endişe olan enfeksiyon riskini azaltma özelliğine sahiptir. Dahası, kendi kendini iyileştirme yetenekleri, uzun vadeli stabilite ve işlevselliğin iyileştirilmesine katkıda bulunarak onu doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için çekici bir seçenek haline getirmektedir. Bu özellikler, CMC/OD bazlı nanokompozit hidrojelleri, birden fazla tıbbi disiplinde tedavi metodolojilerini ilerletmek için umut verici bir aday olarak konumlandırmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] McMahon, R.E., Wang, L., Skoracki, R., Mathur, A.B., "Development of nanomaterials for bone repair and regeneration", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101B(2), s.387–397, 2013.
- [2] Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R., Petite, H., "Engineering bone: challenges and obstacles", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(1), s.72–84, 2005.
- [3] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920–6.
- [4] Hongjian Zhou, Jaebeom Lee Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering *Acta Biomaterialia* Volume 7, Issue 7, July 2011, Pages 2769-2781
- [5] Gönen, S.Ö., Taygun, M.E., ve Küçükbayrak, S., (2016). "Fabrication of bioactive glass containing nanocomposite fiber mats for bone tissue engineering applications", *Composite Structures*, 138: 96-106.
- [6] Swetha, M., Sahithi, K., Moorthi, A., Srinivasan, N., Ramasamy, K., ve Selvamurugan, N., (2010). "Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*, 47: 1-4.
- [7] Ozarslan, A.C. ve Yucel, S., (2016). "Fabrication and characterization of strontium incorporated 3-D bioactive glass scaffolds for bone tissue from biosilica", *Materials Science and Engineering: C*, 68: 350-357.
- [8] Chen, G., Ushida, T., ve Tateishi, T., (2002). "Scaffold design for tissue engineering", *Macromolecular Bioscience*, 2: 67-77.
- [9] J. Jeong, J. H. Kim, J. H. Shim, N. S. Hwang, and C. Y. Heo, "Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration," *Biomater. Res.*, vol. 23, no. 1, 2019, pp. 1–11.

- [10] N. W. Kucko, R.-P. Herber, S. C. G. Leeuwenburgh, and J. A. Jansen, "Principles of Regenerative Medicine, Calcium Phosphate Bioceramics and Cements," in *Principles of Regenerative Medicine*, Third., Elsevier, 2019, pp. 591-611.
- [11] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, and J. . Planell, "Biomaterials in orthopaedics," *J. R. Soc. Interface*, vol. 5, no. 27, pp. 1137–1158, Oct. 2008.
- [12] T. Albrektsson and C. Johansson, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration," *Eur. Spine J.*, vol. 10, pp. S96–S101, 2001, doi: 10.1007/s005860100282.
- [13] S. Samavedi, A. R. Whittington, and A. S. Goldstein, "Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 9, pp. 8037–8045, 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.014.
- [14] N. Y. Mostafa, "Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 94, no. 2–3, pp. 333–341, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.matchemphys.2005.05.011.
- [15] Elliott, J. C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*; Elsevier Science BV: Amsterdam, 1994.
- [16] Chris Arts JJ, Verdonchot N, Schreurs BW, Buma P. The use of a bioresorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in acetabular bone impaction grafting. *Biomaterials* 2006; 27: 1110–1118.
- [17] Venugopal JR, Low S, Choon AT, Kumar AB, Ramakrishna S. Nanobioengineered electrospun composite nanofibers and osteoblasts for bone regeneration. *Artif Organs* 2008; 32: 388–397.
- [18] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 475–483.
- [19] Wei GB, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 4749–4757.

- [20] J.E. Aubin, F. Liu, J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan (Eds.), *Principles of Bone Biology*, Academic Press, San Diego (1996), p. 51.
- [21] Marie PJ. Strontium as therapy for osteoporosis. *Current opinion in pharmacology* 2005;5(6):633–636.
- [22] Yang F, Yang D, Tu J, Zheng Q, Cai L, Wang L. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem cells* 2011;29(6):981–991.
- [23] Rybchyn MS, Slater M, Conigrave AD, Mason RS. An Akt-dependent increase in canonical Wnt signaling and a decrease in sclerostin protein levels are involved in strontium ranelate-induced osteogenic effects in human osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286(27):23771–23779.
- [24] Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta biomaterialia*, 9(8), 7591-7621.
- [25] S.C. Cox, K.K. Mallick, R.I. Walton, Comparison of techniques for the synthesis of hydroxyapatite, *Bioinspired, Biomim. Nanobiomaterials*. 4 (2014) 37–47.
- [26] T.K. Achar, A. Bose, P. Mal, Mechanochemical synthesis of small organic molecules, *Beilstein journal of organic chemistry* 13(1) (2017) 1907-1931.
- [27] T. Shen, C. Koch, T. McCormick, R. Nemanich, J. Huang, J. Huang, The structure and property characteristics of amorphous/nanocrystalline silicon produced by ball milling, *Journal of materials research* 10(1) (1995) 139-148.
- [28] M.H. Santos, M.d. Oliveira, L.P.d.F. Souza, H.S. Mansur, W.L. Vasconcelos, Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process, *Materials Research* 7 (2004) 625-630.

- [29] G. Huang, C.-H. Lu, H.-H. Yang, Magnetic nanomaterials for magnetic bioanalysis, *Novel nanomaterials for biomedical, environmental and energy applications*, Elsevier 2019, pp. 89-109.
- [30] A. Fihri, C. Len, R.S. Varma, A. Solhy, Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis, *Coordination Chemistry Reviews* 347 (2017) 48-76.
- [31] T.T. Hoai, N.K. Nga, L.T. Giang, T.Q. Huy, P.N.M. Tuan, B.T.T. Binh, Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods for rapid formation of bone-like mineralization, *Journal of Electronic Materials* 46 (2017) 5064-5072.
- [32] O. Sinitsyna, A. Veresov, E. Kovaleva, Y.V. Kolen'ko, V. Putlyaev, Y.D. Tretyakov, Synthesis of hydroxyapatite by hydrolysis of α -Ca₃(PO₄)₂, *Russian Chemical Bulletin* 54 (2005) 79-86.
- [33] A. Nakahira, K. Sakamoto, S. Yamaguchi, M. Kaneno, S. Takeda, M. Okazaki, Novel synthesis method of hydroxyapatite whiskers by hydrolysis of alpha-tricalcium phosphate in mixtures of water and organic solvent, *Journal of the American Ceramic Society* 82(8) (1999) 2029-2032.
- [34] A. Asti, L. Gioglio, Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation, *The International journal of artificial organs* 37(3) (2014) 187-205.
- [35] H.F. Pereira, I.F. Cengiz, F.S. Silva, R.L. Reis, J.M. Oliveira, Scaffolds and coatings for bone regeneration, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 31 (2020) 1-16.
- [36] M.-P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell, Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review, *Journal of controlled release* 113(2) (2006) 102-110.
- [37] M.-P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell, Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system?, *Biomaterials* 27(10) (2006) 2171-2177.

- [38] T.W. Bauer, R. Geesink, R. Zimmerman, J.T. McMahon, Hydroxyapatite-coated femoral stems. Histological analysis of components retrieved at autopsy, *JBJS* 73(10) (1991) 1439-1452.
- [39] R.Z. LeGeros, Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics, *Clinical materials* 14(1) (1993) 65-88.
- [40] A.J.W. Johnson, B.A. Herschler, A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair, *Acta biomaterialia* 7(1) (2011) 16-30.
- [41] S.I. Stupp, G.W. Ciegler, Organoapatites: materials for artificial bone. I. Synthesis and microstructure, *Journal of biomedical materials research* 26(2) (1992) 169-183.
- [42] R. Bhowmik, K.S. Katti, D.R. Katti, Molecular interactions of degradable and non-degradable polymers with hydroxyapatite influence mechanics of polymer-hydroxyapatite nanocomposite biomaterials, *International journal of nanotechnology* 6(5-6) (2009) 511-529.
- [43] A. Vats, N. Tolley, J. Polak, J. Gough, Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications, *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* 28(3) (2003) 165-172.
- [44] M.J. Favus, Bisphosphonates for osteoporosis, *New England Journal of Medicine* 363(21) (2010) 2027-2035.
- [45] L.G. Raisz, Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects, *The Journal of clinical investigation* 115(12) (2005) 3318-3325.
- [46] E. Seeman, Bone quality: the material and structural basis of bone strength, *Journal of bone and mineral metabolism* 26 (2008) 1-8.
- [47] C. Cooper, E.J. Atkinson, S.J. Jacobsen, W.M. O'Fallon, L.J. Melton III, Population-based study of survival after osteoporotic fractures, *American journal of epidemiology* 137(9) (1993) 1001-1005.

- [48] M.T. Drake, B.L. Clarke, E.M. Lewiecki, The pathophysiology and treatment of osteoporosis, *Clinical therapeutics* 37(8) (2015) 1837-1850.
- [49] L.C. Hofbauer, M. Schoppet, Bone biology underlying therapeutic approaches, *Translational Endocrinol Metab* 1 (2010) 117-148.
- [50] G. Rodan, A. Reszka, E. Golub, R. Rizzoli, Bone safety of long-term bisphosphonate treatment, *Current medical research and opinion* 20(8) (2004) 1291-1300.
- [51] S. Khosla, J.P. Bilezikian, D.W. Dempster, E.M. Lewiecki, P.D. Miller, R.M. Neer, R.R. Recker, E. Shane, D. Shoback, J.T. Potts, Benefits and risks of bisphosphonate therapy for osteoporosis, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97(7) (2012) 2272-2282.
- [52] J.B. Catterall, T.E. Cawston, Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors, *Arthritis Res Ther* 5 (2002) 1-13.
- [53] R. Russell, N. Watts, F. Ebtino, M. Rogers, Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy, *Osteoporosis international* 19 (2008) 733-759.
- [54] M.R. McClung, P. Geusens, P.D. Miller, H. Zippel, W.G. Bensen, C. Roux, S. Adami, I. Fogelman, T. Diamond, R. Eastell, Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women, *New England journal of medicine* 344(5) (2001) 333-340.
- [55] D.M. Black, P.D. Delmas, R. Eastell, I.R. Reid, S. Boonen, J.A. Cauley, F. Cosman, P. Lakatos, P.C. Leung, Z. Man, Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis, *New England Journal of Medicine* 356(18) (2007) 1809-1822.
- [56] C.H. Chesnut III, A. Skag, C. Christiansen, R. Recker, J.A. Stakkestad, A. Hoiseth, D. Felsenberg, H. Huss, J. Gilbride, R.C. Schimmer, Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis, *Journal of bone and mineral research* 19(8) (2004) 1241-1249.

- [57] E. McCloskey, P. Selby, M. Davies, J. Robinson, R.M. Francis, J. Adams, K. Kayan, M. Beneton, T. Jalava, L. Pylkkänen, Clodronate reduces vertebral fracture risk in women with postmenopausal or secondary osteoporosis: results of a double-blind, placebo-controlled 3-year study, *Journal of bone and mineral research* 19(5) (2004) 728-736.
- [58] Boanini E, Torricelli P, Gazzano M, Fini M, Bigi A. The effect of zoledronate-hydroxyapatite nanocomposites on osteoclasts and osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*. 2012 Jan;33(2):722-30. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.092. Epub 2011 Oct 19. PMID: 22014461.
- [59] Elisa Boanini, Paola Torricelli, Massimo Gazzano, Elena Della Bella, Milena Fini, Adriana Bigi, Combined effect of strontium and zoledronate on hydroxyapatite structure and bone cell responses, *Biomaterials*, Volume 35, Issue 21, 2014, Pages 5619-5626, ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.053>.
- [60] Boanini E, Torricelli P, Sima F, Axente E, Fini M, Mihailescu IN, Bigi A. Strontium and zoledronate hydroxyapatites graded composite coatings for bone prostheses. *J Colloid Interface Sci*. 2015 Jun 15;448:1-7. doi: 10.1016/j.jcis.2015.01.088. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25706198.
- [61] Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, S.V. Madhally, In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 26(36) (2005) 7616-7627.
- [62] A. Tolaimate, J. Desbrieres, M. Rhazi, A. Alagui, Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties, *Polymer* 44(26) (2003) 7939-7952.
- [63] Md. Minhajul Islam, Md. Shahruzzaman, Shanta Biswas, Md. Nurus Sakib, Taslim Ur Rashid, Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review, *Bioactive Materials*, Volume 5, Issue 1, 2020, Pages 164-183, ISSN 2452-199X, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>.
- [64] Z. Shariatnia, A.M. Jalali, Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications, *International journal of biological macromolecules* 115 (2018) 194-220.

- [65] F.Y. Samadi, Z. Mohammadi, M. Yousefi, S. Majdejabbari, Synthesis of raloxifene–chitosan conjugate: a novel chitosan derivative as a potential targeting vehicle, *International journal of biological macromolecules* 82 (2016) 599-606.
- [66] Y. Fazli, Z. Shariatnia, Controlled release of cefazolin sodium antibiotic drug from electrospun chitosan-polyethylene oxide nanofibrous Mats, *Materials science and engineering: C* 71 (2017) 641-652.
- [67] A. Anitha, S. Maya, N. Deepa, K. Chennazhi, S. Nair, H. Tamura, R. Jayakumar, Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells, *Carbohydrate polymers* 83(2) (2011) 452-461.
- [68] V. Sencadas, D.M. Correia, C. Ribeiro, S. Moreira, G. Botelho, J.G. Ribelles, S. Lanceros-Méndez, Physical-chemical properties of cross-linked chitosan electrospun fiber mats, *Polymer Testing* 31(8) (2012) 1062-1069.
- [69] Z. Gu, H. Xie, C. Huang, L. Li, X. Yu, Preparation of chitosan/silk fibroin blending membrane fixed with alginate dialdehyde for wound dressing, *International journal of biological macromolecules* 58 (2013) 121-126.
- [70] E.M. Ivan'kova, I.P. Dobrovolskaya, P.V. Popryadukhin, A. Kryukov, V.E. Yudin, P. Morganti, In-situ cryo-SEM investigation of porous structure formation of chitosan sponges, *Polymer Testing* 52 (2016) 41-45.
- [71] M.S. Islam, P. Haque, T.U. Rashid, M.N. Khan, A.K. Mallik, M.N.I. Khan, M. Khan, M.M. Rahman, Core–shell drug carrier from folate conjugated chitosan obtained from prawn shell for targeted doxorubicin delivery, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 28 (2017) 1-10.
- [72] M.M. Rahman, M. Shahrizzaman, M.S. Islam, M.N. Khan, P. Haque, Preparation and properties of biodegradable polymer/nano-hydroxyapatite bioceramic scaffold for spongy bone regeneration, *Journal of Polymer Engineering* 39(2) (2019) 134-142.

- [73] V. Mourya, N.N. Inamdar, A. Tiwari, Carboxymethyl chitosan and its applications, *Advanced materials letters* 1(1) (2010) 11-33.
- [74] E. Antoniou, Structure-property relationships in associating polymer solutions, State University of New York at Buffalo 2008.
- [75] S.R. Van Tomme, W.E. Hennink, Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications, *Expert Review of Medical Devices* 4(2) (2007) 147-164.
- [76] E. Khalikova, P. Susi, T. Korpela, Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications, *Microbiology and molecular biology reviews* 69(2) (2005) 306-325.
- [77] João Maia, Marta B. Evangelista, Helena Gil and Lino Ferreira Dextran-based materials for biomedical applications *Carbohydrates Applications in Medicine*, 2014: 31-53 ISBN: 978-81-308-0523-8
- [78] J. Maia, R.A. Carvalho, J.F. Coelho, P.N. Simões, M.H. Gil, Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes, *Polymer* 52(2) (2011) 258-265.
- [79] J.-P. Draye, B. Delaey, A. Van de Voorde, A. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, E. Schacht, In vitro release characteristics of bioactive molecules from dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films, *Biomaterials* 19(1-3) (1998) 99-107.
- [80] Q. Hou, A. Paul, K.M. Shakesheff, Injectable scaffolds for tissue regeneration, *Journal of Materials Chemistry* 14(13) (2004) 1915-1923.
- [81] N.E. Fedorovich, M.H. Oudshoorn, D. van Geemen, W.E. Hennink, J. Alblas, W.J. Dhert, The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels, *Biomaterials* 30(3) (2009) 344-353.
- [82] B. Balakrishnan, N. Joshi, R. Banerjee, Borate aided Schiff's base formation yields in situ gelling hydrogels for cartilage regeneration, *Journal of Materials Chemistry B* 1(41) (2013) 5564-5577.

- [83] Weichang Xue, Howard L.Hosick, Amit Bandyopadhyay, Susmita Bose, Chuanxian Ding, K.D.K.Luk, K.M.C.Cheung, W.W.Lu "Preparation and cell–materials interactions of plasma sprayed strontium-containing hydroxyapatite coating" *Surface and Coatings Technology* Volume 201, Issue 8, 15 January 2007, Pages 4685-4693.
- [84] G.-I. Kontogianni, C. Coelho, R. Gauthier, S. Fiorilli, P. Quadros, C. Vitale-Brovarone, M. Chatzinikolaïdou, Osteogenic potential of nano-hydroxyapatite and strontium-substituted nano-hydroxyapatite, *Nanomaterials* 13(12) (2023) 1881.
- [85] Yu Zhuang, Anqi Liu, Shengjie Jiang, Usman Liaqat, Kaili Lin, Wenjun Sun, Changyong Yuan, Promoting vascularized bone regeneration via strontium-incorporated hydroxyapatite bioceramic, *Materials & Design*, Volume 234, 2023, 112313, ISSN 0264-1275, <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.112313>.
- [86] C.I. Codrea, D. Lincu, I. Atkinson, D.C. Culita, A.-M. Croitoru, G. Dolete, R. Trusca, B.S. Vasile, M.S. Stan, D. Ficai, Comparison between Two Different Synthesis Methods of Strontium-Doped Hydroxyapatite Designed for Osteoporotic Bone Restoration, *Materials* 17(7) (2024) 1472.
- [87] C.I. Codrea, D. Baykara, R.-A. Mitran, A.C.Ç. Koyuncu, O. Gunduz, A. Ficai, 3D-Bioprinted Gelatin Methacryloyl-Strontium-Doped Hydroxyapatite Composite Hydrogels Scaffolds for Bone Tissue Regeneration, *Polymers* 16(13) (2024) 1932.
- [88] A.M. Dias, I. do Nascimento Canhas, C.G.O. Bruziquesi, M.G. Speziali, R.D. Sinisterra, M.E. Cortés, Magnesium (Mg^{2+}), strontium (Sr^{2+}), and zinc (Zn^{2+}) Co-substituted bone cements based on nano-hydroxyapatite/monetite for bone regeneration, *Biological trace element research* 201(6) (2023) 2963-2981.
- [89] X.-y. Zhang, Y.-p. Chen, J. Han, J. Mo, P.-f. Dong, Y.-h. Zhuo, Y. Feng, Biocompatible silk fibroin/carboxymethyl chitosan/strontium substituted hydroxyapatite/cellulose nanocrystal composite scaffolds for bone tissue engineering, *International journal of biological macromolecules* 136 (2019) 1247-1257.
- [90] I. Ullah, Q. Xu, H.U. Jan, L. Ren, K. Yang, Effects of strontium and zinc substituted plasma

sprayed hydroxyapatite coating on bone-like apatite layer formation and cell-material interaction, *Materials Chemistry and Physics* 275 (2022) 125219.

[91] B. Yedekçi, A. Tezcaner, B. Yılmaz, T. Demir, Z. Evis, 3D porous PCL-PEG-PCL/strontium, magnesium and boron multi-doped hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 125 (2022) 104941.

[92] X. Zhang, G. Song, H. Qiao, J. Lan, B. Wang, H. Yang, L. Ma, S. Wang, Z. Wang, H. Lin, Novel ternary vancomycin/strontium doped hydroxyapatite/graphene oxide bioactive composite coatings electrodeposited on titanium substrate for orthopedic applications, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 603 (2020) 125223.

[93] Yong Lei, Zhengliang Xu, Qinfei Ke, Wenjing Yin, Yixuan Chen, Changqing Zhang, Yaping Guo "Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced osteoinductivity for bone tissue engineering" *Materials Science and Engineering: C* Volume 72, 1 March 2017, Pages 134-142.

[94] K. Wong, C. Wong, W. Liu, H. Pan, M. Fong, W. Lam, W. Cheung, W. Tang, K. Chiu, K. Luk, Mechanical properties and in vitro response of strontium-containing hydroxyapatite/polyetheretherketone composites, *Biomaterials* 30(23-24) (2009) 3810-3817.

[95] Deepak Kumar Khajuria, Ramakrishna Vasireddi, Martin Trebbin, David Karasi, Rema Razdan, Novel therapeutic intervention for osteoporosis prepared with strontium hydroxyapatite and zoledronic acid: In vitro and pharmacodynamic evaluation *Materials Science and Engineering: C* Volume 71, 1 February 2017, Pages 698-708.

[96] Q. Yuan, Z. Zhang, Y. Yang, Y. Jian, R. Li, X. Dai, W. Wu, J. Zhong, C. Chen, Synthesis, characterization and biological performance study of Sr-doped hydroxyapatite/chitosan composite coatings, *Materials Chemistry and Physics* 270 (2021) 124752.

[97] Y. Lu, M. Li, L. Li, S. Wei, X. Hu, X. Wang, G. Shan, Y. Zhang, H. Xia, Q. Yin, High-activity chitosan/nano hydroxyapatite/zoledronic acid scaffolds for simultaneous tumor

inhibition, bone repair and infection eradication, *Materials Science and Engineering: C* 82 (2018) 225-233.

[98] Q. Xue, Y. Wang, Impact of hyperbaric oxygen on nano-hydroxyapatite/carboxymethyl chitosan/zoledronic acid biocomposite for bone tissue engineering, *Journal of Cluster Science* 33(3) (2022) 999-1005.

[99] Xiaojie Fang, Sidi Zhu, Jianzhe Ma, Fengyun Wang, Haihua Xu, Mingzhu Xi "The facile synthesis of zoledronate functionalized hydroxyapatite amorphous hybrid nanobiomaterial and its excellent removal performance on Pb^{2+} and Cu^{2+} " *Journal of Hazardous Materials* Volume 392, 15 June 2020, 122291.

[100] Piyachat Chuysinuan, Patcharakamon Nooeaid, Thanyaluck Thanyacharoen, Supanna Techasakul, Prasit Pavasant, Kavita Kanjanamekanant, Injectable eggshell-derived hydroxyapatite-incorporated fibroin-alginate composite hydrogel for bone tissue engineering *International Journal of Biological Macromolecules* Volume 193, Part A, 15 December 2021, Pages 799-808.

[101] Zhen Cao, Xiao Bai, Chongbin Wang, Liling Ren, Dongyang Ma, A simple polysaccharide based injectable hydrogel compositing nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering *Materials Letters* Volume 293, 15 June 2021, 129755.

[102] M. Głąb, S. Kudłacik-Kramarczyk, A. Drabczyk, J. Walter, A. Kordyka, M. Godzierz, R. Bogucki, B. Tyliczszak, A. Sobczak-Kupiec, Hydroxyapatite obtained via the wet precipitation method and PVP/PVA matrix as components of polymer-ceramic composites for biomedical applications, *Molecules* 26(14) (2021) 4268.

[103] Yibin Yu, Hao Pan, Yingying Wang, Wei Xiong, Qiantao Zhang, Kai Chen, Xiumei Gai, Pingfei Li and Xinggong Yang New insights into an innovative *Auricularia auricular* polysaccharide pH-sensitive hydrogel for controlled protein drug delivery *RSC Adv.*, 2016, 6, 59794 DOI: 10.1039/C6RA06463A

- [104] V. Kumar, T. Yang, Analysis of carboxyl content in oxidized celluloses by solid-state ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 184, Issue 2, 1999, Pages 219-226, ISSN 0378-5173, [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00098-8).
- [105] A. Lisman, B. Butruk, I. Wasiak, T. Ciach, Dextran/Albumin hydrogel sealant for Dacron® vascular prosthesis, *Journal of Biomaterials Applications* 28(9) (2014) 1386-1396.
- [106] H.A. Bilgic, B. Kilic, B.D. Kockaya, B.E. Sarac, A.K. Suloglu, O. Kalayci, C. Karaaslan, Oxidative stress stimulation leads to cell-specific oxidant and antioxidant responses in airway resident and inflammatory cells, *Life sciences* 315 (2023) 121358.
- [107] Momtahan, Nima; Panahi, Tayyeb; Poornejad, Nafiseh; Stewart, Michael G.; Vance, Brady R.; Struk, Jeremy A.; Castleton, Arthur A.; Roeder, Beverly L.; Sukavaneshvar, Sivaprasad; Cook, Alonzo D.. Using Hemolysis as a Novel Method for Assessment of Cytotoxicity and Blood Compatibility of Decellularized Heart Tissues. *ASAIO Journal* 62(3):p 340-348, May/June 2016. | DOI: 10.1097/MAT.0000000000000373
- [108] Jin-Kang Zhang, Liu Yang, Guo-Lin Meng, Jing Fan, Jian-Zong Chen, Qi-Zhen He, Shi Chen, Jin-Zhu Fan, Zhuo-Jing Luo, Jian Liu, Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cells, *European Journal of Pharmacology*, Volume 689, Issues 1–3, 2012, Pages 31-37, ISSN 0014-2999, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.045>.
- [109] Kang Liu, Jianfeng Zhao, Liushu Yang, Meng Guan, Ling Yuan, Yu Geng, Protective effects of calbindin-D28K on the UVB radiation-induced apoptosis of human lens epithelial cells *International Journal of Molecular Medicine* March 26, 2020 Pages: 1793-1802 <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4552>
- [110] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibnsouda, ‘Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review’, *J Pharm Anal*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.

- [111] E. Urnukhsaikhan, B.-E. Bold, A. Gunbileg, N. Sukhbaatar, and T. Mishig-Ochir, 'Antibacterial activity and characteristics of silver nanoparticles biosynthesized from *Carduus crispus*', *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, p. 21047, Oct. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00520-2.
- [112] B.T. Amaechi, P.A. AbdulAzees, D.O. Alshareif, M.A. Shehata, P.P.d.C.S. Lima, A. Abdollahi, P.S. Kalkhorani, V. Evans, Comparative efficacy of a hydroxyapatite and a fluoride toothpaste for prevention and remineralization of dental caries in children, *BDJ open* 5(1) (2019) 18.
- [113] E. Boanini, M. Gazzano, A. Bigi, Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta biomaterialia* 6(6) (2010) 1882-1894.
- [114] Zhen Geng, Zhenduo Cui, Zhaoyang Li, Shengli Zhu, Yanqin Liang, Yunde Liu, Xue Li, Xin He, Xiaoxu Yu, Renfeng Wang, Xianjin Yang, Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 58, 2016, Pages 467-477, ISSN 0928-4931, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.061>.
- [115] S.J. Kalita, A. Bhardwaj, H.A. Bhatt, Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering, *Mater. Sci. Eng. C* 27 (2007) 441–449, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.018>.
- [116] A. El-Ghannam, P. Ducheyne, in: P. Ducheyne (Ed.), 1.109 - Bioactive Ceramics, Elsevier, Oxford, 2011, pp. 157–179.
- [117] H. El Boujaady, M. Mourabet, A. El Rhilassi, M. Bennani-Ziatni, R. El Hamri, A. Taitai, Adsorption of a textile dye on synthesized calcium deficient hydroxyapatite (CDHAp): Kinetic and thermodynamic studies, *J. Mater. Environ. Sci* 7(11) (2016) 4049-4063.
- [118] A. Bigi, E. Boanini, M. Gazzano, 7 - Ion substitution in biological and synthetic apatites, Editor(s): Conrado Aparicio, Maria-Pau Ginebra, *Biomaterialization and Biomaterials*, Woodhead Publishing, 2016, Pages 235-266, ISBN 9781782423386, <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-338-6.00008-9>.

- [119] M. Frasnelli, F. Cristofaro, V.M. Sglavo, S. Dirè, E. Callone, R. Ceccato, G. Bruni, A.I. Cornaglia, L. Visai, Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration, *Materials Science and Engineering: C* 71 (2017) 653-662.
- [120] Li, Z. Y.; Lam, W. M.; Yang, C.; Xu, B.; Ni, G. X.; Abbah, S. A.; Cheung, K. M. C.; Luk, K. D. K.; Lu, W. W. Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials* 2007, 28, 1452–1460.
- [121] Z.-L. Xu, Y. Lei, W.-J. Yin, Y.-X. Chen, Q.-F. Ke, Y.-P. Guo, C.-Q. Zhang, Enhanced antibacterial activity and osteoinductivity of Ag-loaded strontium hydroxyapatite/chitosan porous scaffolds for bone tissue engineering, *Journal of Materials Chemistry B* 4(48) (2016) 7919-7928.
- [122] F. Scalera, F. Gervaso, K.P. Sanosh, A. Sannino, A. Licciulli, Influence of the calcination temperature on morphological and mechanical properties of highly porous hydroxyapatite scaffolds, *Ceramics International*, Volume 39, Issue 5, 2013, Pages 4839-4846, ISSN 0272-8842, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.11.076>
- [123] Deepak Kumar Khajuria, Rema Razdan, Debiprosad Roy Mahapatra, Development, in vitro and in vivo characterization of zoledronic acid functionalized hydroxyapatite nanoparticle based formulation for treatment of osteoporosis in animal model, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 66, 2015, Pages 173-183, ISSN 0928-0987, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.10.015>.
- [124] Ling Li, Ning Wang, Xun Jin, Rui Deng, Shihong Nie, Lu Sun, Qinjie Wu, Yuquan Wei, Changyang Gong, Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention, *Biomaterials*, Volume 35, Issue 12, 2014, Pages 3903-3917, ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.050>.
- [125] Peng Ding, Yuanyuan Lu, Chenxu Zhao, Wei Guo, Lei Nie, Preparation of injectable self-healing hydrogels using carboxymethyl chitosan and oxidized dextran with incorporating quercetin-loaded PF127 micelles for wound healing, *Materials Today Communications*, Volume 41, 2024, 110463, ISSN 2352-4928, <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2024.110463>

[126] Jingjun Wu, Qian Zhao, Chengzhen Liangb and Tao XieaEnzymatically degradable oxidized dextran–chitosan hydrogels with an anisotropic aligned porous structure RSC Soft Matter, 2013,9, 11136-11142

[127] Zhu Aiping, Liu Jianhong, Ye Wenhui, Effective loading and controlled release of camptothecin by O-carboxymethylchitosan aggregates, Carbohydrate Polymers, Volume 63, Issue 1, 2006, Pages 89-96, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.006>.

[128] A.M.A. Nada, Mohamed El-Sakhawy, Samir Kamel, M.A.M. Eid, Abeer M. Adel, Mechanical and electrical properties of paper sheets treated with chitosan and its derivatives, Carbohydrate Polymers, Volume 63, Issue 1, 2006, Pages 113-121, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.028>.

[129] B. Ren, X. Chen, S. Du, Y. Ma, H. Chen, G. Yuan, J. Li, D. Xiong, H. Tan, Z. Ling, Injectable polysaccharide hydrogel embedded with hydroxyapatite and calcium carbonate for drug delivery and bone tissue engineering, International journal of biological macromolecules 118 (2018) 1257-1266.

[130] Karolinekersin Enoch, Anbumozhi Angayarkanni Somasundaram, Rheological insights on Carboxymethyl cellulose hydrogels, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 253, Part 8, 2023, 127481, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127481>.

[131] Y.-J. Seong, G. Lin, B.J. Kim, H.-E. Kim, S. Kim, S.-H. Jeong, Hyaluronic acid-based hybrid hydrogel microspheres with enhanced structural stability and high injectability, ACS omega 4(9) (2019) 13834-13844.

[132] B. Abderrahim, E. Abderrahman, A. Mohamed, T. Fatima, T. Abdesselam, O. Krim, Kinetic thermal degradation of cellulose, polybutylene succinate and a green composite: comparative study, World J. Environ. Eng 3(4) (2015) 95-110.

- [133] S. Borhan, S. Hesarak, A.-A. Behnamghader, E. Ghasemi, Rheological evaluations and in vitro studies of injectable bioactive glass–polycaprolactone–sodium alginate composites, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 27 (2016) 1-15.
- [134] Xinxin Ding, Xue Li, Chunyan Li, Manlin Qi, Zhe Zhang, Xiaolin Sun, Lin Wang, and Yanmin Zhou Chitosan/Dextran Hydrogel Constructs Containing Strontium-Doped Hydroxyapatite with Enhanced Osteogenic Potential in Rat Cranium *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2019 5 (9), 4574-4586 DOI: 10.1021/acsbiomaterials.9b00584
- [135] Z. Li, C. He, B. Yuan, X. Dong, X. Chen, Injectable polysaccharide hydrogels as biocompatible platforms for localized and sustained delivery of antibiotics for preventing local infections, *Macromolecular bioscience* 17(4) (2017) 1600347.
- [136] J. Li, X. Liu, S. Park, A.L. Miller, A. Terzic, L. Lu, Strontium-substituted hydroxyapatite stimulates osteogenesis on poly (propylene fumarate) nanocomposite scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 107(3) (2019) 631-642.
- [137] Lima IR, Santos SRA, Santiago DL, Rossi AM and Granjeiro JM. Cytotoxicity analysis of apatites modified with divalent metals. *Key Engineering Materials* 2008; 20(2):1135-1138. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.361-363.1135>
- [138] W. Xue, J.L. Moore, H.L. Hosick, S. Bose, A. Bandyopadhyay, W. Lu, K.M. Cheung, K.D. Luk, Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics, *Journal of biomedical materials research Part A* 79(4) (2006) 804-814.
- [139] C. Capuccini, P. Torricelli, F. Sima, E. Boanini, C. Ristoscu, B. Bracci, G. Socol, M. Fini, I.N. Mihailescu, A. Bigi, Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response, *Acta Biomaterialia*, Volume 4, Issue 6, 2008, Pages 1885-1893, ISSN 1742-7061, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.05.005>.
- [140] Y. Cai, T. Gao, S. Fu, P. Sun, Development of zoledronic acid functionalized hydroxyapatite loaded polymeric nanoparticles for the treatment of osteoporosis, *Experimental and Therapeutic Medicine* 16(2) (2018) 704-710.

- [141] Wen-Chun Lin, Chun-Chieh Lien, Hsiu-Jen Yeh, Chao-Ming Yu, Shan-hui Hsu, Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications, *Carbohydrate Polymers*, Volume 94, Issue 1, 2013, Pages 603-611, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.076>.
- [142] R.T. Monteiro, F.K. Andrade, N.F. Vasconcelos, K.A. Nogueira, R. Petrilli, R.S. Vieira, Production and characterization of alginate bilayer membranes for releasing simvastatin to treat wounds, *Biointerphases* 15(4) (2020).
- [143] M. Parekh, V. Romano, K. Hassanin, V. Testa, R. Wongvisavavit, S. Ferrari, A. Haneef, C. Willoughby, D. Ponzin, V. Jhanji, Biomaterials for corneal endothelial cell culture and tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering* 12 (2021) 2041731421990536.
- [144] A. Riemann, B. Schneider, A. Ihling, M. Nowak, C. Sauvart, O. Thews, M. Gekle, Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells, *PloS one* 6(7) (2011) e22445.
- [145] E. Boanini, P. Torricelli, M. Fini, A. Bigi, Osteopenic bone cell response to strontium-substituted hydroxyapatite, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22 (2011) 2079-2088.
- [146] B. Pan, L.B. To, A.N. Farrugia, D.M. Findlay, J. Green, S. Gronthos, A. Evdokiou, K. Lynch, G.J. Atkins, A.C. Zannettino, The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro, *Bone* 34(1) (2004) 112-123.
- [147] Suratwala, Sanjeev J.; Cho, Samuel K.; van Raalte, Jonathan J.; Park, Sang Hyun; Seo, Sung Wook; Chang, Seong-Sil; Gardner, Thomas R.; Lee, Francis Young-In. Enhancement of Periprosthetic Bone Quality with Topical Hydroxyapatite-Bisphosphonate Composite. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 90(10):p 2189-2196, October 01, 2008. | DOI: 10.2106/JBJS.G.00409

- [148] Isabel R. Orriss, Michelle L. Key, Kay W. Colston, Timothy R. Arnett Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates *Journal of cellular biochemistry*, 2009, 106, 109-118. doi.org/10.1002/jcb.21983
- [149] Aparna Naidu, Paul C. Dechow, Robert Spears, John M. Wright, Harvey P. Kessler, Lynne A. Opperman, The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, Volume 106, Issue 1, 2008, Pages 5-13, ISSN 1079-2104, <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.03.036>.
- [150] G.-X. Ni, Z.-P. Yao, G.-T. Huang, W.-G. Liu, W.W. Lu, The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts in vitro, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22 (2011) 961-967.
- [151] X. Zhao, H. Wu, B. Guo, R. Dong, Y. Qiu, P.X. Ma, Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing, *Biomaterials* 122 (2017) 34-47.
- [152] K. Yang, X. Zhou, Z. Li, Z. Wang, Y. Luo, L. Deng, D. He, Ultrastretchable, self-healable, and tissue-adhesive hydrogel dressings involving nanoscale tannic acid/ferric ion complexes for combating bacterial infection and promoting wound healing, *ACS Applied Materials & Interfaces* 14(38) (2022) 43010-43025.
- [153] Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257–272. <https://doi.org/10.1080/08905439209549838>
- [154] X. Fei Liu, Y. Lin Guan, D. Zhi Yang, Z. Li, K. De Yao, Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, *Journal of applied polymer science* 79(7) (2001) 1324-1335.
- [155] A. Anitha, V.D. Rani, R. Krishna, V. Sreeja, N. Selvamurugan, S. Nair, H. Tamura, R. Jayakumar, Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles, *Carbohydrate polymers* 78(4) (2009) 672-677.

- [156] C. Simons, S.E. Walsh, J.Y. Maillard, A. Russell, A note: ortho-phthalaldehyde: proposed mechanism of action of a new antimicrobial agent, *Letters in Applied Microbiology* 31(4) (2000) 299-302.
- [157] M.A. Aziz, J.D. Cabral, H.J. Brooks, S.C. Moratti, L.R. Hanton, Antimicrobial properties of a chitosan dextran-based hydrogel for surgical use, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56(1) (2012) 280-287.
- [158] N. Baheiraei, H. Eyni, B. Bakhshi, R. Najafloo, N. Rabiee, Effects of strontium ions with potential antibacterial activity on in vivo bone regeneration, *Scientific Reports* 11(1) (2021) 8745.
- [159] J. Liu, S.C. Rawlinson, R.G. Hill, F. Fortune, Strontium-substituted bioactive glasses in vitro osteogenic and antibacterial effects, *Dental Materials* 32(3) (2016) 412-422.
- [160] A. Leon, L. Liu, Y. Yang, M.P. Hudock, P. Hall, F. Yin, D. Studer, K.-J. Puan, C.T. Morita, E. Oldfield, Isoprenoid biosynthesis as a drug target: bisphosphonate inhibition of *Escherichia coli* K12 growth and synergistic effects of fosmidomycin, *Journal of medicinal chemistry* 49(25) (2006) 7331-7341.

EKLER

Ek 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar

Ozgen, A., Kilic, B., Ghaffarlou, M., Karaaslan, C., & Aydin, H. M. (2025). Injectable carboxymethyl chitosan/oxidized dextran hydrogels containing zoledronic acid modified strontium hydroxyapatite nanoparticles. *RSC Advances*, 15(6), 4014-4028.



PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)
Cite this: *RSC Adv.*, 2025, 15, 4014

Injectable carboxymethyl chitosan/oxidized dextran hydrogels containing zoledronic acid modified strontium hydroxyapatite nanoparticles

 Alkin Ozgen,^a Busra Kilic,^b Mohammadreza Ghaffarlou,^a
 Cagatay Karaaslan^b and Halil Murat Aydin^{*ac}

Nanocomposite hydrogels have potential in bone regeneration due to the inorganic and polymeric material content. In this study, new types of nanocomposite hydrogels composed of zoledronic acid/strontium hydroxyapatite nanoparticles and carboxymethyl chitosan/oxidized dextran (CMC/OD) hydrogels were reported. Pure hydroxyapatite, 5%, 10% and 15% (w/w) strontium-substituted strontium hydroxyapatite nanoparticles were produced and then modified with zoledronic acid at ratios of 5% to 7.5% (w/w). These modified structures were then incorporated into CMC/OD hydrogels. Zoledronic acid modified strontium hydroxyapatite nanoparticles were characterized using Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) and X-ray Diffraction (XRD). CMC/OD structures were investigated using Fourier Transform Infrared Analysis (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM). The physical properties of the hydrogels were determined via degradation behavior and rheological measurements. Cell–material interactions were investigated *in vitro*. The results showed that the incorporation of hydroxyapatite nanoparticles into CMC would significantly improve the rheological properties. The addition of strontium to hydroxyapatite nanoparticles significantly enhanced cell proliferation. In addition, a significant increase in alkaline phosphatase (ALP) and calcium deposition was observed with the addition of zoledronic acid. In conclusion, the nanocomposite hydrogels of CMC/OD containing zoledronic acid modified strontium hydroxyapatite demonstrate potential for orthopedic and craniofacial applications due to their superior properties, including the ability to be easily injected into targeted areas, potent antibacterial activity that helps prevent infections and remarkable self-healing capabilities that promote tissue regeneration and repair.

 Received 15th November 2024
 Accepted 10th January 2025

DOI: 10.1039/d4ra08123d

rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

Bone offers a multitude of purposes, including the formation of the main support structure design, being the binding site and mechanical support for muscles and tendons.¹ Bone is not homogeneously solid, it is composed of living bone cells, collagen fibers and inorganic minerals in the form of small crystals in a biomineral environment.² Bone defects pose a major surgical challenge and significantly reduce the quality of life of patients due to their limited regenerative potential.³ Biomaterial-based tissue engineering and regenerative medicine methods have exciting potential to overcome such disadvantages.⁴

The most effective successful osteoinductive materials for the treatment of bone injuries are grafts and calcium phosphate ceramic materials such as hydroxyapatite.⁵ However, allografts

and xenografts have disadvantages such as high cost, limited availability, the challenge of developing personalized products and risk of disease transmission.^{6,7} Calcium phosphates, the primary component of bone, primarily consist of calcium and phosphate, along with trace amounts of magnesium, carbonate, hydroxyl, chloride, and fluoride ions. Due to the natural presence of H_2PO_4^- and PO_4^{3-} ions in the inorganic phase of bone, calcium phosphate-based graft materials show excellent biological activity in orthopedic applications. Calcium phosphates have a porous structure that allows blood and body fluids to penetrate the bone. This feature increases the material's dissolution rate and enhances tissue–material interaction. The most popular calcium phosphate ceramics are hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP). The physical and chemical properties of calcium phosphate ceramics vary depending on the manufacturing processes and conditions. The osteoinductive and osteoconductive properties of calcium phosphate ceramics are important for bone regeneration as they support cell adhesion and proliferation. In particular, properties such as surface roughness, phase content, solubility, crystallinity and porosity affect cell adhesion and proliferation.^{8–12} The ability of hydroxyapatite to form tight bonds with native tissues is

^aBioengineering Division, Institute of Science, Hacettepe University, Beytepe, Ankara, 06800, Turkey. E-mail: hmaydin@hacettepe.edu.tr

^bMolecular Biology Section, Department of Biology, Faculty of Science, Hacettepe University, Beytepe, Ankara, 06800, Turkey

^cCentre for Bioengineering, Hacettepe University, Beytepe, Ankara, 06800, Turkey

