

Y⁺³ ve F⁻ Eklenmiş Nano-Hidroksiapatit Biyoseramiklerinin Çöktürme Yöntemi ile Üretilerek İç Yapı, Mekanik ve Biyoyumluluk Özellikleri Yönünden İncelenmesi

Proje No: 105M271

Doç. Dr. Zafer EVİS
Doç. Dr. Ayşen TEZCANER
Yrd. Doç. Dr. Dilek KESKİN

ARALIK 2010
ANKARA

ÖNSÖZ

TÜBİTAK tarafından desteklenen MAG 105M271 no'lu ve “Y⁺³ ve F Eklenmiş Nano-Hidroksiapatit Biyoseramiklerinin Çöktürme Yöntemi ile Üretilerek İç Yapı, Mekanik ve Biyoyumluluk Özellikleri Yönünden İncelenmesi” adlı proje 01.05.2006-01.11.2010 tarihleri arasında ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü'nde yürütülmüştür. Proje kapsamında nano boyuttaki HA'ya çeşitli oranlarda itriyum ve flor iyonları eklenerek iç yapı, mekanik ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi ele alınmıştır. Saf ve iyon eklenmiş HA'lar çöktürme metodu ile sentezlenip farklı sıcaklıklarda sinterlenmişlerdir. Yüksek yoğunlukta malzemeler elde edilmiş olup ikincil faz oluşumlarına rastlanmamıştır. Eklenen iyonlar elementler ve artan sıcaklıklar hücrelerin daha iyi yapışmasını ve çoğalmasını sağlamıştır. Eklenen iyonların saf HA ile karşılaştırıldıklarında hücrelerin kemik yönüne farklılaşmaları üzerine belirgin pozitif arttırıcı bir etkisi gözlenmemiştir. Ancak kullanılan tüm kompozisyonlar ve sinterleme sıcaklıklarında hazırlanan biyomalzemeler biyoyumludur. Deneysel çalışmanın neticesinde, 2.5YFHA'nın saf HA'ya göre en umut verici malzeme olduğu görülmüştür.

Proje kapsamında iki adet öğrenci “İtriyum ve flor eklenmiş nano-hidroksiapatitin iç yapı, mekanik ve biyoyumluluk incelemeleri” ve “Flor ilave edilmiş itriyum hidroksiapatitin mikroyapı, mikrosertlik ve biyoyumluluk özelliklerinin incelenmesi” başlıklı yüksek lisans tezlerini hazırlamış ve mezun olmuşlardır. Bu proje konularından 4-adet uluslararası makale (SCI), 1-adet uluslararası konferans sunumu ve 3-adet ulusal konferans sunumu gerçekleştirilmiştir.

Projenin gerçekleştirilmesine sağladığı maddi destek için TÜBİTAK'a şükranlarımızı sunarız. Bu projede yürütülen deneysel çalışmaların çok büyük bir kısmı, ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, Prof. Dr. Turgut Tokdemir ve Prof. Dr. Ruşen Geçit'e desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	xiv
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Apatitler.....	4
2.2. Üretim Yöntemleri	4
2.3. Sinterlenme.....	6
2.3.1. Hidroksiapatit'in İç Yapısı.....	7
2.3.2. Hidroksiapatitin Faz Dönüşümleri	8
2.3.3. Hidroksiapatitin Mekanik Özellikleri	9
2.3.4. Hidroksiapatitin Biyolojik Özellikleri	11
2.4. Nano Hidroksiapatit'e Çeşitli İyonların Eklenmesi	12
2.4.1. İyon Eklenmiş Nano Hidroksiapatit'lerin İç Yapı Özellikleri	13
2.4.2. İyon Eklenmiş Nano Hidroksiapatit'lerin Biyolojik Özellikleri.....	16
2.4.3. İyon Eklenmiş Nano Hidroksiapatitlerin Mekanik Özellikleri.....	17
2.4.4. Hidroksiapatitin İtiryum ile Zenginleştirilmesi.....	18
2.4.5 Hidroksiapatitin Flor ile Zenginleştirilmesi.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21

3.1. Malzemelerin Üretilmesi.....	21
3.1.1. Nano-hidroksiapatit Üretilmesi.....	21
3.1.2. Y ³⁺ ve F ⁻ Eklenmiş HA'ların Üretimi.....	22
3.2. Karakterizasyon Metodları.....	22
3.2.1. Malzemelerin Yoğunluklarının Ölçülmesi.....	22
3.2.2. X-ışınları Difraksiyonu Metodu ile Malzemelerin İç Yapılarının İncelenmesi.....	23
3.2.3. Diyametral Mukavemet Testi ile Malzemelerin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi.....	24
3.2.4. FTIR ve RAMAN Spektroskopisi.....	26
3.2.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	26
3.2.6. Vickers Mikro-Sertlik.....	27
3.2.7. Kırılma Tokluğu.....	27
3.2.8. Y ³⁺ ve F ⁻ Eklenmiş nano-HA Biyoseramiklerinin in Vitro Biyoyumluluklarının İncelenmesi.....	28
3.2.8.1. Disklerden Elde Edilen Ekstraktlarda İn Vitro Sitoksisite Çalışmaları.....	29
3.2.8.1.1. MTT Canlılık Testleri.....	29
3.2.8.1.2. Histolojik Boyamalar.....	29
3.2.8.2. Hücre Yapışması ve Çoğalması.....	30
3.2.8.3 ALP Analizleri.....	31
3.2.8.4. Kalsiyum Birikimi Analizi.....	32
3.2.8.5. Kollajen Tip I ve Osteokalsein Birikimi Analizleri.....	33
3.2.8.5.1. Western Blotting.....	33
3.2.8.5.2. İmmunohistokimyasal Analizler.....	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Malzemelerin Yoğunluklarının Hesaplanması	37

4.2. Üretilen Malzemelerin X-ışınları Difraksiyonu ile İç Yapı İncelenmeleri	38
4.3. Malzemelerin Diyametral Mukavemet Test Sonuçları	46
4.4. FTIR ve RAMAN Spektroskopileri.....	48
4.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	58
4.6. Vickers Mikro-sertlik	63
4.7. Kırılma Tokluğu.....	65
4.8. İn Vitro Biyouyumluluk Testleri.....	67
4.8.1 HA ve İyonla Zenginleştirilmiş HA Disk Ekstraktlarında İn Vitro Sitoksisite Çalışmaları.....	67
4.8.1.1 MTT Canlılık Testleri.....	67
4.8.1.2. Histolojik Boyamalar.....	68
4.8.2. Saf ve İyon Eklenmiş HA Disklerinde Hücre Yapışması ve Çoğalması.....	74
4.8.3. Saf ve İyon Eklenmiş HA Diskler Üzerine Ekilen Hücre Morfolojileri.....	80
4.8.4. ALP Aktiviteleri.....	82
4.8.5. Kalsiyum Birikimi Analizleri	86
4.8.6. Kolajen Tip I ve Osteokalsein Birikimi Analizleri.....	91
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	97
KAYNAKÇA	98
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	106

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Hegzagonal HA yapısında bulunan atomların pozisyonları [39]	8
Tablo 2.2	HA'da değişik sentez metotlarında değişik sıcaklıklarda meydana gelen faz dönüşümleri [26, 43-47]	9
Tablo 2.3	HA ve kemiğin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması	10
Tablo 2.4	HA'ya eklenen elementlerin HA yapısındaki konumları	12
Tablo 2.5	Bazı elementlerin iyonik yarıçapları ve HA'nin latis parametreleri ve kristalinitesi üzerindeki etkileri	13
Tablo 2.6	Çeşitli iyonlar eklenmiş farklı HA'ların iç yapı özellikleri [18,56,57,61].	14
Tablo 3.1	Saf hidroksiapatitin ve Y^{+3} ve F^- eklenmiş hidroksiapatitlerin kısa gösterimleri	22
Tablo 4.1	Malzemelerin sinterleme sıcaklıklarına göre rölatif yoğunlukları	36
Tablo 4.2	Üretilen malzemelerin hegzagonal kafes parametreleri ve bu parametrelerdeki ve hacimlerdeki değişimler: a) 900°C sinterlenen numuneler; b) 1100°C sinterlenen numuneler; c) 1300°C sinterlenen numuneler.....	45
Tablo 4.3	Saf HA ve Y^{+3} ve F^- eklenmiş HA'ların farklı sıcaklıklarda sinterlenmeleri sonucunda Sherrer formülü kullanılarak hesaplanan tane boyutları "D" (nm).....	46
Tablo 4.4	Saf hidroksiapatit ve florapatit (FHA) için FTIR frekansları ve bunlara karşılık gelen bant ve bağlar [89, 90].....	53
Tablo 4.5	Saf hidroksiapatit ve florapatit (FHA) için Raman frekansları ve bunlara karşılık gelen bant ve bağlar [89,90].....	58
Tablo 4.6	Saf HA ve Y^{3+} ve F^- eklenmiş HA'ların, 900°C, 1100°C, ve 1300°C'lerde 1 saat sinterlenmeleri sonucunda oluşan tane boyutları. Not: Tane boyutları Şekiller 4.17-4.20'de bulunan taramalı elektron mikroskobu fotoğraflarından hesaplanmıştır.....	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	İnsan kortikal kemiğinin yapısı [10].....	2
Şekil 3.1	HA'nın çöktürme metodu ile üretimi: a) 0.5 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 'ın saf suda çözündürülmesi, b) 0.3M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 'ın saf suda çözündürülmesi, c) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltilerinin pH 11-12'de karıştırılmaları sonucunda oluşan HA'nın oda sıcaklığında karışımı.....	21
Şekil 3.2	a) HA çözeltisinin filtrelenmesi, b) Kurutulmuş HA'nın 1100°C 'de sinterlenmesi, c) Arşimed formülünde kullanmak için sinterlenmiş HA'nın su içerisinde ağırlığının hassas terazide ölçülmesi.....	23
Şekil 3.3	Diyametral mukavemet testi.....	25
Şekil 3.4	Vickers mikro-sertlik testinde oluşan Palmqvist ve Halfpenny şekilli çatlakların üstten ve yandan görünüşleri.....	28
Şekil 3.5	Jel elektroforez düzeneği.....	34
Şekil 3.6.	Jelde yürütülen örnekler ve protein sabiti.....	34
Şekil 3.7.	Membrana bloklama işleminin uygulanması.....	35
Şekil 4.1	HA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart HA, b) JCPDS#: 09-169 numaralı karta göre standart β -TCP, c) JCPDS#: 09-348 numaralı karta göre standart α -TCP, d) 100°C 'de kurutulmuş HA, e) 1100°C 'de 1 saat sinterlenmiş HA.....	38
Şekil 4.2	Y^{3+} ve F^- ilave edilmiş HA'ların XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart HA, b) 200°C 'de kurutulmuş % 2.5 Y^{3+} ve % 2.5 F^- ilave edilmiş HA, c) 200°C 'de kurutulmuş % 5 Y^{3+} ve % 2.5 F^- ilave edilmiş HA, d) 200°C 'de kurutulmuş % 7.5 Y^{3+} ve % 2.5 F^- ilave edilmiş HA.....	39

Şekil 4.3	HA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart HA, b) 200°C'de kurutulmuş HA, c) 600°C'de 30 dakika kalsine edilmiş HA, d) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, e) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, f) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş HA.....	40
Şekil 4.4	2.5YFHA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart 2.5YFHA, b) 200°C'de kurutulmuş 2.5YFHA, c) 600°C'de 30 dakika kalsine edilmiş 2.5YFHA, d) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, e) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, f) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA.....	41
Şekil 4.5	5YFHA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart 5YFHA, b) 200°C'de kurutulmuş 5YFHA, c) 600°C'de 30 dakika kalsine edilmiş 5YFHA, d) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, e) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, f) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA.....	42
Şekil 4.6	7.5YFHA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart 7.5YFHA, b) 200°C'de kurutulmuş 7.5YFHA, c) 600°C'de 30 dakika kalsine edilmiş 7.5YFHA, d) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, e) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, f) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA.....	43
Şekil 4.7	Saf HA ile Y ³⁺ ve F ⁻ eklenmiş HA'ların sıcaklıkla diyametral mukavemet değişimi.....	47
Şekil 4.8	Saf HA ile Y ³⁺ ve F ⁻ eklenmiş HA'ların yoğunluklarına göre diyametral mukavemet değişimleri.....	48
Şekil 4.9	Saf HA'nın FTIR metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş HA.....	49

Şekil 4.10	2.5YFHA'nın FTIR metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA.....	50
Şekil 4.11	5YFHA'nın FTIR metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA..	51
Şekil 4.12	7.5YFHA'nın FTIR metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA.....	52
Şekil 4.13	Saf HA'nın Raman metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş HA.....	54
Şekil 4.14	2.5YFHA'nın Raman metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA.....	55
Şekil 4.15	5YFHA'nın Raman metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA...	56
Şekil 4.16	7.5YFHA'nın Raman metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA.....	57
Şekil 4.17	Saf HA'nın taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş HA.....	59

Şekil 4.18	2.5YFHA'nın taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA....	60
Şekil 4.19	5YFHA'nın taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA.....	61
Şekil 4.20	7.5YFHA'nın taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA.....	62
Şekil 4.21	Saf HA ve Y ³⁺ ve F ⁻ eklenmiş HA'ların, 900°C, 1100°C, ve 1300°C'lerde 1 saat sinterlenmelerine bağlı olarak gösterdikleri mikro-sertlik değişimleri.....	64
Şekil 4.22	Saf HA ve Y ³⁺ ve F ⁻ eklenmiş HA'ların, 900°C, 1100°C, ve 1300°C'lerde 1 saat sinterlenmelerine bağlı olarak gösterdikleri kırılma tokluğu değişimleri.....	66
Şekil 4.23	900°C'de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin 2 günlük inkübasyon sonucunda hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	67
Şekil 4.24.	1100°C'de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin 2 günlük inkübasyon sonucunda hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	68
Şekil 4.25	1300°C'de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin 2 günlük inkübasyon sonucunda hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	68
Şekil 4.26.	900°C'de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin kollajen boyama faz kontrast ışık mikroskobisi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA.....	69
Şekil 4.27.	1100°C'de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin kollajen boyama faz kontrast ışık mikroskobisi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA.....	70

- Şekil 4.28.** 1300°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin kollajen boyama faz kontrast ışık mikroskobisi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA..... 71
- Şekil 4.29.** 900°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin kalsiyum boyama faz kontrast ışık mikroskobisi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA..... 72
- Şekil 4.30.** 1100°C’de sinterlenen çeşitli kompozisyonlardaki hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin kalsiyum boyama faz kontrast ışık mikroskobi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA..... 73
- Şekil 4.31.** 1300°C’de sinterlenen çeşitli kompozisyonlardaki hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin boyama faz kontrast ışık mikroskobi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA..... 74
- Şekil 4.32.** 900°C, 1100°C ve 1300°C’de sinterlenmiş saf ve iyon eklenmiş HA diskler üzerinde 24 saat inkübe edilmiş hücrelerin yapışma yüzdeleri (yapışma yüzdeleri TCPS’ler üzerine yapışan hücreler referans alınarak hesaplanmıştır)..... 75
- Şekil 4.33.** 900°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücre çoğalması; TCPS üzerine ekilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır (*, **, ¥, γ, ρ, + işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, p<0.05)..... 76
- Şekil 4.34.** 1100°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücre çoğalmaları, TCPS üzerine ekilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır (*, **, ¥, γ, ρ, + işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, p<0.05)..... 78
- Şekil 4.35.** 1300°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücre çoğalmaları; TCPS üzerine ekilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır (*, **, ~, +, #, işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, p<0.05)..... 79

Şekil 4.36.	Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş HA diskler üzerinde 5 günlük inkubasyon sonunda Saos-2 hücrelerinin taramalı electron mikroskopi görüntüleri: a) 900°C, b) 1100°C, c) 1300°C.....	80
Şekil 4.37.	Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş 2.5YFHA diskler üzerinde 5 günlük inkubasyon sonunda Saos-2 hücrelerinin taramalı electron mikroskopi görüntüleri: a) 900 °C, b) 1100°C, c) 1300°C.....	81
Şekil 4.38.	Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş 5YFHA diskler üzerinde 5 günlük inkubasyon sonunda Saos-2 hücrelerinin taramalı electron mikroskopi görüntüleri: a) 900°C, b) 1100°C, c) 1300°C.....	81
Şekil 4.39.	Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş 7.5YFHA diskler üzerinde 5 günlük inkubasyon sonunda Saos-2 hücrelerinin taramalı electron mikroskopi görüntüleri: a) 900°C, b) 1100°C, c) 1300°C.....	82
Şekil 4.40.	900°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücrelerin 7 ve 14 günlük inkübasyonlar sonundaki ALP aktiviteleri (*, +, ¥, ¤ işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, p<0.05).....	83
Şekil 4.41	1100°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücrelerin 7 ve 14 günlük inkübasyonlar sonundaki ALP aktiviteleri (*, # işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, p<0.05).....	84
Şekil 4.42.	1300°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücrelerin 7 ve 14 günlük inkübasyonlar sonundaki ALP aktiviteleri (£, §, +, *, ¥, □, # işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, p<0.05)....	85
Şekil 4.43.	7 ve 14 günlük inkübasyon sonunda 900 °C’de sinterlenmiş HA disklerinin kalsiyum içeriği (*, #, ¥, □: p<0.05 gruplar arasındaki belirgin farklar).....	87
Şekil 4.44.	7 ve 14 günlük inkübasyon sonunda 1100°C’de sinterlenmiş HA disklerinin kalsiyum içeriği (*, #, ¥, +, £: p<0.05 gruplar arasındaki belirgin farklar).....	88

Şekil 4.45.	7 ve 14 günlük inkübasyon sonunda 1300°C'de sinterlenmiş HA disklerinin kalsiyum içeriği (*, #, ¥, +: p<0.05 gruplar arasındaki belirgin farklar).....	89
Şekil 4.46.	1300°C'de sinterlenen saf hidroksiapatit örneğinin elde edilen FTIR-ATR spektroskopisi grafiği.....	90
Şekil 4.47.	Farklı sıcaklıklarda sinterlenen HA ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerine ekilen Saos-2 hücrelerinin 21 günlük inkübasyon sonucu hücre fazının mineralizasyon düzeylerinin karşılaştırılması.	91
Şekil 4.48.	1100°C'de sinterlenen hidroksiapatit diskleri ile kültive edilen hücre lizatlarının osteokalsein western blotlama sonunda elde edilen X-ray filmi üzerindeki sinyalleri.....	92
Şekil 4.49.	Saf ve Y ⁺³ ve F ⁻ iyonları ile zenginleştirilmiş HA diskler ile birlikte kültive edilen hücrelerin sentezlediği kolajen tip I için immunohistokimyasal boyamalar.....	94
Şekil 4.50.	Saf ve Y ⁺³ ve F ⁻ iyonları ile zenginleştirilmiş HA diskler ile birlikte kültive edilen hücrelerin sentezlediği kolajen tip I için immunohistokimyasal boyamalardan Image J yazılımı ile sayısal değerlendirilmesi.....	95
Şekil 4.51.	Saf ve Y ⁺³ ve F ⁻ iyonları ile zenginleştirilmiş HA diskler ile birlikte kültive edilen hücrelerin sentezlediği osteokalsein için immunohistokimyasal boyamalardan Image J yazılımı ile sayısal değerlendirilmesi.....	95
Şekil 4.52.	Saf ve Y ⁺³ ve F ⁻ iyonları ile zenginleştirilmiş HA diskler ile birlikte kültive edilen hücrelerin sentezlediği osteokalsein için immunohistokimyasal boyamalardan Image J yazılımı ile sayısal değerlendirilmesi.....	96

KISALTMALAR

ALP	: Alkalin fosfataz
AMP	: Adenozin monofosfat
APS	: Amonyum persülfat
D	: Tane boyutu
DMEM	: Dulbecco Minimal Eagle Vasatı
EDTA	: Etilen diamin difosfat
FA	: Floraapatit
FHA	: Flor eklenmiş hidroksiapatit
FBS	: Fetal sığır serumu
HA	: Hidroksiapatit
HRP	: At peroksidaz enzimi
IgG	: Immunoglobulin G
JCPDS	: Joint Committee on Powder Diffraction Standards
MTT	: 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
S	: Diyametral mukavemet
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
TCP	: Üç-kalsiyum fosfat
TCPS	: Hücre kültür polisitiren plakalar
TEMED	: Tetrametilmetilen diamine
TRAP	: Tartar asidine dayanıklı asit fosfataz
XRD	: X-ışını kırınımı
2.5YFHA	: 2.5% Y ⁺³ -2.5% F ⁻ -HA
5YFHA	: 5% Y ⁺³ -2.5% F ⁻ -HA
7.5YFHA	: 7.5% Y ⁺³ -2.5% F ⁻ -HA

ÖZET

Nano hidroksiapatit'in tane boyutlarının kemikte bulunan apatit minerallerine olan yakınlığından dolayı, nano hidroksiapatit üzerinde yapılan araştırmalar giderek büyük önem kazanmaktadır. Bu projede nano boyuttaki HA'ya çeşitli oranlarda itriyum ve flor iyonları eklenerek iç yapı, mekanik ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Saf ve iyon eklenmiş HA'lar çöktürme metodu ile sentezlenmiştir. 900°C, 1100°C ve 1300°C'de 1'er saat sinterlendikten sonra içyapılarını incelemek için XRD, FTIR (ve Raman) spektroskopisi ve SEM incelemeleri yapılmıştır. Yoğunlukları oldukça yüksek (% 88'in üstünde) malzemeler elde edilmiştir. İkincil faz oluşumlarına rastlanmamıştır. İyon eklenmiş HA'ların hegzagonal latis parametreleri ve birim hücre hacimleri saf HA'ya göre azalmıştır. Bu sonuçlar iyonların yer değiştirdiği ancak HA bozunmadığını göstermektedir. FTIR grafiklerinde HA'nın karakteristik eğrileri ile birlikte florun yer değiştirmesi sonucu oluşan diğer eğrilere de rastlanmıştır. SEM fotoğrafları eklenen elementlerin oranları arttıkça ve sıcaklıklar azaldıkça tane boyutlarının azaldığını göstermiştir. Soğuk presle hazırlanan diskler 900°C, 1100°C ve 1300°C'de 1'er saat sinterlendikten sonra mekanik özellikleri (mikro-sertlik, kırılma tokluğu ve diyametral mukavemet testi) incelenmiştir. Mekanik özellikler sinterleme sıcaklıkları ve eklenen elementlerin miktarları ile doğrudan ilgilidir.

Saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin biyouyumlulukları sitotoksosite çalışmaları ile yapılmıştır. Hücre yapışması, çoğalması, ALP ve depolanan kolajen, osteokalsein ve kalsiyum miktarları MTT, SEM ve ALP analizleri, immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak çalışılmıştır. Eklenen elementler ve artan sıcaklıklar hücrelerin daha iyi yapışmasını ve çoğalmasını sağlamıştır. Eklenen iyonların saf HA ile karşılaştırıldıklarında hücrelerin kemik yönüne farklılaşmaları üzerine belirgin pozitif arttırıcı bir etkisi gözlenmemiştir. Ancak kullanılan tüm kompozisyonlar ve sinterleme sıcaklıklarında hazırlanan biyomalzemeler biyouyumludur. En yüksek ALP aktiviteleri, kalsiyum, kolajen ve osteokalsein miktarları 1100°C'de sinterlenen malzemeler üzerinde gözlenmiştir. Hücrelerin farklılaşma özellikleri eklenen elementlerin konsantrasyonuna bağlıdır. 900°C sinterleme sıcaklığında iyonlarla zenginleştirilmiş HA disklerde gözlenen osteokalsein seviyeleri HA disklerde gözlenen miktarlardan yüksek olduğu bulunmuştur. Hücre çalışmalarında en iyi sonuçlar 1100°C'de sinterlenen HA'lerde görülmüştür. Özellikle bu sıcaklıktaki 2.5YFHA'nın saf HA'ya göre en umut verici malzeme olduğu söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Nano Hidroksiapatit, İtiryum, Flor, Mekanik Özellikler, Biyolojik Özellikler

ABSTRACT

Due to the resemblance of grain sizes of nano hydroxyapatite to that of apatite minerals in bone, the researches on nano hydroxyapatite have become to gain great importance. In this project, it was aimed to investigate the structural, mechanical and biological properties of nano hydroxyapatite (HA) doped with yttrium and fluoride ions with different compositions. HAs were synthesized by precipitation method. After sintering at 900°C, 1100°C or 1300°C for 1 hour, the structural properties of HAs were investigated by XRD, FTIR (and Raman) spectroscopy and SEM. High relative densities (above 88 % of relative density) were achieved after sintering. No second phases were observed in XRD measurements. Hexagonal lattice parameters and unit cell volumes of doped HAs decreased indicating the substitutions of ions. Characteristics absorption bands of HA and additional bands due to fluoride substitutions were observed in FTIR patterns. SEM images showed that grain sizes decreased with increasing doping amounts and decreasing sintering temperatures. Discs prepared by cold pressing were sintered at 900°C, 1100°C and 1300°C for 1 hour to determine mechanical properties (micro-hardness, fracture toughness and diametral strength test). Mechanical properties of HAs were found to be directly related to the sintering temperatures and amount of dopings.

Biocompatibility of pure and doped HA discs was assessed with in vitro cytotoxicity studies. Cell attachment, proliferation and differentiation state of cells were studied using MTT, SEM analyses, ALP and calcium assays and immunohistochemical staining for collagen type I and osteocalcein. Cell attachment and proliferation were enhanced with dopings and increasing sintering temperatures. Doping of HA with these two ions did not have a significant positive effect on the osteogenic differentiation of the cells. However, biomaterials prepared by different compositions and sintered at different temperatures were found biocompatible. The highest ALP production and calcium deposition were observed on HAs sintered at 1100°C. Osteocalcein levels of cells in the presence of all doped were higher than that of HA at 900°C sintering temperature. *In vitro* studies revealed that 1100°C was the sintering temperature for best cell responses. Specifically, 2.5YFHA seemed to be promising as an alternative for pure HA among all doped HAs.

Keywords: Nano Hydroxyapatite, Yttrium, Fluoride, Mechanical Properties, Biological Properties.

1. GİRİŞ

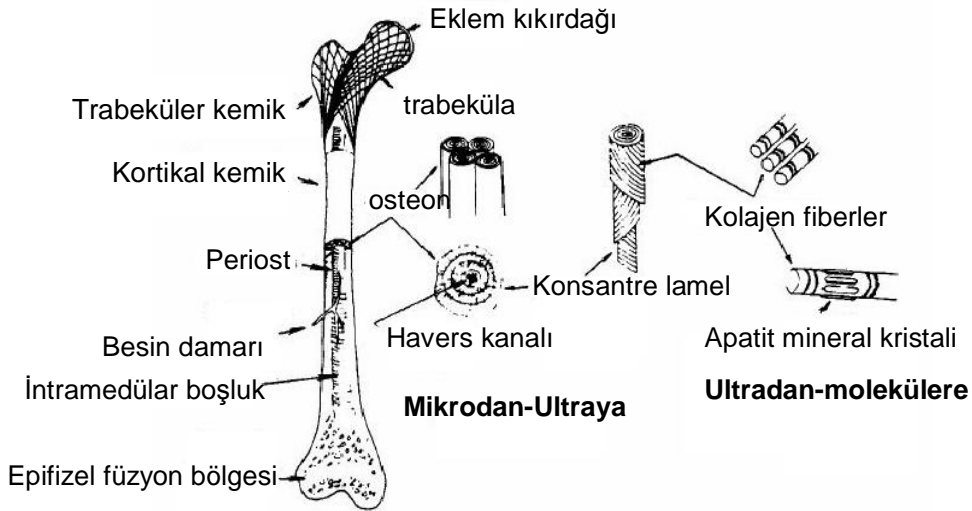
Son 50 yıl içinde kalsiyum fosfatlar üzerinde yapılan çalışmaların sonucunda, bu malzemelerin sağlık alanındaki uygulamaları ve kullanımı oldukça artmıştır. Kalsiyum fosfatlar vücudun içerisinde yüksek biyouyumluluk göstermektedirler. Biyoseramikler içinde en çok dikkat çekenler kalsiyum fosfatlardır, çünkü kalsiyum fosfatların element kompozisyonu, kemik ve dişte bulunan minerallerle büyük benzerlik göstermektedir. Kalsiyum fosfatların kırılma tokluklarının düşük olmalarından veya mekanik özelliklerinin zayıflığından dolayı aşırı yüklere karşı dayanıksızdırlar. Bu özellikleri yüzünden yük taşınması gerekmeyen bölgelerde kullanılmaları daha uygundur.

Kalsiyum fosfatlar içerisinde en öne çıkan malzemeler ise hidroksiapatit (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ve üç-kalsiyum fosfattır (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). HA yüksek biyouyumluluğu, yavaş bozunması, kimyasal yapısının kemik mineraline en çok benzerlik göstermesinden dolayı ve TCP ise vücut içindeki yüksek bozunma hızından dolayı önemlidir. HA'nın zayıf olan mekanik özelliklerini güçlendirmek ve biyolojik özelliklerini daha yüksek seviyelere çıkartmak amacı ile nano kristalli HA üretilmesi konusunda yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Şu anda yeni trend ise tek fazlı HA veya TCP üretilmesi yerine çift fazlı HA ve TCP içeren kompozitlerin üretilmesidir. Bu şekilde biyouyumluluk veya mekanik özellikler yönünden özellikleri daha iyileştirilmiş malzemeler üretilmesidir.

HA'nın kimyasal yapısı içerisinde Ca ve P elementleri bulunmaktadır. Bunlar kemik ve dişin inorganik kısmında bulunan elementlerdir. Bu malzeme için, kompozisyonunda aynı elementleri içerdiğinden, vücudun yabancı malzemelere karşı gösterdiği tepkiler çok daha az olmakta ve genç kemik hücreleri HA yüzeyine yapışabilmekte ve çoğalabilmektedirler. Hatta HA'nın yüksek biyoaktivitesi sayesinde kemikle malzeme ara yüzeyinde çok kuvvetli bağlar oluşabilmektedir. Bu bağların kuvveti bazen o kadar yüksek olmaktadırki, ortopedide kullanılan implant metaller üzerine kaplama yapılmış HA'lara genç kemik hücreleri o kadar kuvvetli yapışırki, HA kaplamayı metal yüzeyinden söker alır ve bu ise enfeksiyonlara yol açma tehlikesi oluşturabilir. Kaplamalara ilaveten, direkt olarak kullanılan HA'lar mekanik özellikleri bakımından zayıf kalmaktadır. Ayrıca sentetik HA, doğal kemiğe göre mekanik yönden daha zayıftır, biyoaktivitesinde de farklılıklar vardır. Doğal kemikte bulunan HA, sentetik HA'ya göre biyolojik olarak daha aktiftir [1]. Nano-tane boyutlarına sahip HA üretimi kemikte bulunan HA'ya daha çok benzerlik gösterecektir.

Sentetik HA'nın zayıf yönlerini kuvvetlendirmek için son 10 yıl içerisinde pek çok çalışma yapılmıştır [2-7]. Hem mekanik hem de biyolojik yönlerden gelişme sağlamak için, çalışmalar nano kristalli HA üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun temelinde yatan en önemli neden ise kemik minerallerini oluşturan HA'lar nano tanelere sahiptir.

Kemik kalsiyum fosfat tuzları, organik kısım ve sudan oluşmaktadır. Kemik makroskopik olarak kortikal (sıkı yapılı) ve trabeküler (süngerisi) kemikten oluşmaktadır. Kortikal (sıkı yapılı) kemiğin ağırlıkça % 69'unu kalsiyum fosfat mineraller, % 22'sini organikler ve % 9'unu da su oluşturmaktadır [8]. Organik fazın ise ağırlıkça % 95'ini kolajen (tip I) oluşturmaktadır, geri kalan kısım ise proteoglikanlar ve başka kolajen olmayan proteinlerdir [9]. İnsanın femur kemiğinin makro seviyeden nano seviyeye olan değişimleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Sıkı kemik dokusu havers kanalları denilen küçük gözeneklerden meydana gelir, ayrıca Volkman kanalları, lakün ve kanaliküli diye adlandırılan yapılar da bulunur [10,11]. Kemiğin mineral kısmı çeşitli iyonlar (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , CO_3^{2-} , Cl^- , F^-) da içeren HA'dan meydana gelir [12]. Biyolojik apatitler kolajen faz içinde iğneler şeklinde bulunurlar; kalınlıkları 1,5-7,5 nm ve uzunlukları da 20-70 nm arasındadır [8,9,13]. HA kristalleri kolajen yapı içerisinde yayılmaktadır.



Şekil 1.1. İnsan kortikal kemiğinin yapısı [10].

Nano HA'nın tane boyutlarının kemikte bulunan minerallerin tane boyutlarına yakınlığından dolayı, nano HA üzerinde yapılan araştırmalar giderek büyük önem kazanmaktadır. Bu çalışmada ise, mikron tane boyutlarına ve nano tane boyutlarına sahip HA'ların özellikleri farklı bakış açılarından irdelenmiştir. Nano taneli HA'nın üretim

metodları, biyolojik uyumlulukları, fiziksel ve iç yapı özellikler ve mekanik özellikleri hakkında genel bilgiler verilmiştir.

Bu projede nano boyuttaki HA'ya çeşitli oranlarda itriyum ve flor iyonları eklenerek iç yapı, mekanik ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Saf ve iyon eklenmiş HA'lar çöktürme metodu ile sentezlenmiştir. 900°C, 1100°C ve 1300°C'de 1'er saat sinterlendikten sonra içyapılarını incelemek için XRD, FTIR (ve Raman) spektroskopisi ve SEM incelemeleri yapılmıştır. Yoğunlukları oldukça yüksek (% 88'in üstünde) malzemeler elde edilmiştir. İkincil faz oluşumlarına rastlanmamıştır. İyon eklenmiş HA'ların hegzagonal latis parametreleri ve birim hücre hacimleri saf HA'ya göre azalmıştır. Bu sonuçlar iyonların yer değiştirdiği ancak HA bozunmadığını göstermektedir. FTIR grafiklerinde HA'nın karakteristik eğrileri ile birlikte florun yer değiştirmesi sonucu oluşan diğer eğrilere de rastlanmıştır. SEM fotoğrafları eklenen elementlerin oranları arttıkça ve sıcaklıklar azaldıkça tane boyutlarının azaldığını göstermiştir. Soğuk presle hazırlanan diskler 900°C, 1100°C ve 1300°C'de 1'er saat sinterlendikten sonra mekanik özellikleri (mikro-sertlik, kırılma tokluğu ve diyametral mukavemet testi) incelenmiştir. Mekanik özellikler sinterleme sıcaklıkları ve eklenen elementlerin miktarları ile doğrudan ilgilidir

Saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin biyoyumlulukları sitotoksite çalışmaları ile yapılmıştır. Hücre yapışması, çoğalması, ALP ve depolanan miktarları MTT, ALP analizleri ve SEM kullanılarak çalışılmıştır. Eklenen elementler ve artan sıcaklıklar hücrelerin daha iyi yapışmasını ve çoğalmasını sağlamıştır. En yüksek ALP aktiviteleri ve kalsiyum miktarları 1100°C'de sinterlenen malzemeler üzerinde gözlenmiştir. Hücrelerin farklılaşma özellikleri eklenen elementlerin konsantrasyonuna bağlıdır. Hücre çalışmalarında en iyi sonuçlar 1100°C'de sinterlenen HA'larda görülmüştür. Özellikle bu sıcaklıktaki 2.5YFHA'nın saf HA'ya göre en umut verici malzeme olduğu söylenebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Apatitler

Apatit mineralleri çok geniş bir yelpazede farklı iyonlardan oluşmakta ve yerin altında doğal olarak bulunmaktadır. Apatitlere çeşitli iyonlar eklenebilir bundan dolayıda apatitlerin çok geniş bir uygulama alanları vardır [14]. Örneğin, Ca^{2+} veya Pb^{2+} içeren arsenik ve fosfat kökenli apatitler ($\text{Pb}_5(\text{AsO}_4)_3\text{OH}$) çevre amaçlı olarak kirli suların yada kirli toprağın temizlenmesinde kullanılabilir [15]. Ayrıca, oksii-apatitler ($\text{La}_{9,33}(\text{SiO}_4)_6\text{O}_2$, $\text{La}_{8,65}\text{Sr}_{1,35}(\text{SiO}_4)_6\text{O}_{2,32}$) ise katı oksit yakıt pilleri uygulamalarında kullanılabilir [16].

HPO_4^{2-} veya CO_3^{2-} ilave edilmiş veya Ca^{2+} ve OH^- eksik apatitler ($\text{Ca}_{10-x}[(\text{PO}_4)_{6-2x}(\text{CO}_3)_{2x}](\text{OH})_2$, $\text{Ca}_{10-x}[(\text{PO}_4)_{6-2x}(\text{CO}_3)_{2x}]\text{CO}_3$, $\text{Ca}_{10-x}[(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x](\text{OH})_{2-x}$) biyomedikal alanda kullanılan apatitlerden bir kaçını içermektedir [17]. Biyomedikal alanda kullanılan bu apatitler arasında en öne çıkan ise hidroksiapatittir [18-20].

HA kemik mineraline olan kimyasal benzerliği sebebiyle, kaplamalar ve kemik greftleri gibi birçok ortopedik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır [1, 21]. HA uygulama alanına göre toz veya partikül formunda kullanılabilir [1, 21]. HA ile ilgili bazı önemli ayrıntılar aşağıda tartışılmaktadır.

2.2. Üretim Yöntemleri

Son 10 yıl içerisinde pek çok farklı metot kullanılarak değişik boyutlarda nano kristalli HA elde edilmiştir. 1995'te Luo ve ark. tarafından kalsiyum nitrat ve amonyum fosfat kullanılarak, solüsyon spreyi kurutma metodu ile tane boyutu 20 nm civarında HA'lar elde edilmiştir [22]. Xu ve ark. ise nano HA sentezleyebilmek için radyo frekanslı plazma sprey metodunu kullanarak 10 ile 100 nm boyutları arasında değişen HA tozları elde etmeyi başarmışlardır [23].

Sol-jel metodu kullanılarak sitokiometrik HA ($\text{Ca/P}=1,67$) üretmek daha kolaydır. Ayrıca diğer metotlara göre daha düşük sıcaklıklarda işlem yapılır. Fakat bu metotla sentezlenen HA'lar her zaman ikincil bir kalsiyum fosfat fazı içerirler. Bundan dolayı, kullanılan kimyasalların miktarları sitokiometrik HA üretmek için çok doğru şekilde belirlenmelidir. Bu metotta çözücü olarak pek çok değişik madde kullanılabilir: etanol, jeller, fosforlar ve alkoksitler kullanılabilen çözücülerdendir. Kuriakose ve ark. etanol çözücü kullanarak bu metotla 8-10 nm boyutlarda HA elde edilmiştir [24]. Han ve ark. ise sitrik asitli yanmalı sol-jel metodunu kullanarak boyutları 80 ile 150 nm arasında değişen HA'lar elde

etmişlerdir [25]. Kalita ve ark etanol ve su bazlı sol-jel teknikleri kullanarak 10-50 nm boyutlarında nano kristalli HA tozları üretmişlerdir [1].

Hidroliz yöntemi kullanılarak da nano HA elde edilmiştir. Shih ve ark. bu metot ile sitokiometrik ve 20 nm boyutlarında nano HA'lar üretilmiştir [26].

Sarig ve ark. oda sıcaklığında ve 7,4 pH seviyesinde seyreltik kalsiyum klorit ve sodyum fosfat solüsyonlarının doğrudan çöktürülmesi ile plaka şeklinde nano kristalli HA'lar elde etmişlerdir [27]. Bu pH'da üretilmesinin nedeni medikal uygulamalarda kullanılabilir olmasını sağlamak içindir. Ayrıca doğrudan çöktürmeyi sağlayabilmek içinde solüsyonlar karıştırıldıktan hemen sonra mikrodalga ışınlaması kullanılmıştır.

Bir başka kullanılan yöntem ise mekanokimyasal metottur. Bu metot Manuell ve ark. tarafından katı halde nano HA üretmekte kullanılmış oldukça zorlu bir yöntemdir [28]. Bu metotta nano HA ve TCP sentezlemek için kalsiyum oksit (CaO) ve kalsiyum hidrojen fosfat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) kullanılmıştır.

Son olarak ise çöktürme metodu ile nano tanecikli HA üretimi mümkündür [18-20,29]. İlk olarak Prof. Robert H. Doremus ve öğrencileri tarafından geliştirilen bu metot ile sitokiyometrik ve nano tane boyutlarına sahip HA üretimi mümkün olmuştur [30].

Çöktürme metodunda, Ca/P oranı 1.667 olacak şekilde kalsiyum nitrat ve amonyum fosfat kimyasalları belli molar değerlerde, pH değeri 11-12 olacak şekilde bazik ortamda amonyum hidroksit eklenerek bir solüsyon oluşturulur [18]. Bu kimyasalların belli bir süre karıştırılması neticesinde, çok sıkı yapılı filtre kağıtları ile bu solüsyon filtrelenir ve filtre kağıtı üzerinde kalan ıslak tortuya kek denmektedir. Bu kek 100°C sıcaklıkta kurutulmuş olarak içerisinde bulunan fiziksel su kekten uzaklaştırılır. Kurutulmuş olan kekin 1100°C'de 1 saat sinterlenmesi sonucunda saf HA herhangi bir ikincil faz içermeyen üretilmektedir. Ayrıca bu sinterleme işlemi neticesinde yoğunluğu HA'nın teorik yoğunluğu olan 3.156 g/cm³'e yakın yüksek yoğunlukta HA herhangi kuvvet uygulaması olmadan üretilir. Isıl işlemin çöktürme metoduyla üretilen HA'da ikincil faz oluşumuna sebep olmadığı, fakat HA'nın tanecik boyutunu etkilediği gözlenmiştir [31]. Sıcaklık artışının tanecik boyutunda artışa sebep olduğu bulunmuştur [31]. Bu bulgular çöktürme metoduyla üretilen HA'in tanecik boyutunun ısı işlem ile kontrol edilebileceğini ve uygun sıcaklıkta ısı işlem uygulanarak nano boyutta tanecik elde edilebileceğini göstermektedir. Nano-boyutta HA kristalleri elde etmek biyoaktiviteyi ve osseointegrasyonu artırması açısından biyomedikal uygulamalar için önemlidir [32, 33]. Bu nedenle, çöktürme metodu özellikle biyomedikal alanda kullanılacak HA'in üretimi için umut vadeden bir metottur.

2.3. Sinterlenme

Mikron boyuttaki taneciklere sahip HA'lar, nano tanecikli HA'ya göre aynı sıcaklıkta sinterlenmeleri sonucunda daha kolay bozunurlar. Mikron tane boyutlu HA'lar homojen bir yapıya sahip olmayabilirler. Mikron tane boyutlu HA'ların sinterlenmeleri zor olduğu için, daha yoğun bir malzeme elde etmek için çok yüksek sıcaklıklara (örneğin 1200°C ve üzeri) ihtiyaç duyulur. Yüksek sıcaklıklarda sinterlendiğinde daha çabuk bozunup istenmeyen ikincil fazlar oluşmakta ve homojen olmayan tane boyutlarına sahip tanecikler meydana gelmektedir. Yüksek sıcaklıklarda sinterlenen HA'lar, CaO ve TCP'ye bozunma eğilimindedir. Bu ikincil fazların oluşumu ve iri taneli yapı oluşumu, biyouyumluluk ve mekanik özelliklerin zayıflamasını getirir [34-36].

Homojen bir yapıya sahip nano boyutta HA'lar elde edebilmek için araştırmalar yapılmaktadır [34,35,37]. Nano HA'lar daha düşük sıcaklıklarda (1100°C'nin altında) sinterlenebilmekte ve yüksek sıcaklıklarda meydana gelebilecek sorunlar önlenebilmektedir [34, 35].

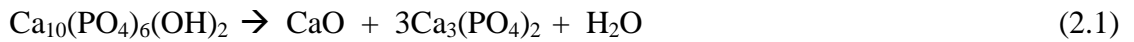
Malzemenin kararlılığını, sinterlenme şartlarını ve mekanik özelliklerini etkileyen ve belirleyen başlıca faktörler malzemenin kimyasal kompozisyonu, tane boyutları ve yüzey kimyasıdır. Ayrıca nano tanecikli HA sentezlenirken ortamın pH derecesi de oldukça önemli bir parametredir. Nano tanecikli HA üretilmesi için çöktürme metodunun artıları vardır.

Çöktürme metodu ile üretim sırasında, solüsyonu karıştırma süresi ve sıcaklıkları da istenilen özellikleri elde etmede önemli faktörlerdir [37]. Karıştırma zamanı daha uzun olduğunda (100 saat) elde edilen malzeme sinterleme sonucunda daha küçük tane boyutuna (≈ 50 nm) sahip olmaktadır [37]. Böylelikle malzemede ikincil fazların oluşması engellenir ve bu malzeme daha kolay sinterlenebilmektedir. Karıştırma sıcaklıklarını değerlendirmek için yapılan deneylerde de, oda sıcaklığına yakın sıcaklıkta (25°C'de) karıştırılandan, daha düşük sıcaklıkta (0°C'de) karıştırılana göre, sitokimietrik ve kimyasal açılardan daha iyi sonuçlar alınmıştır. 0°C'de karıştırılan solüsyondan, sitokimietrik değer elde edilememiştir (Ca/P=1,67 yerine 1,44 bulunmuştur) ve malzeme sinterlendiğinde büyük taneli β -TCP'lere ayrılmıştır. 25°C'de karıştırılıp elde edilen tozlar ise daha kolay sinterlenmiş, nano boyutta HA'lar elde edilmiştir. Hatta 80°C'de karıştırılan solüsyondan çöktürülen HA sinterlendiğinde 100 nm boyutunda pelit yapıda HA'lar elde edilmiştir [37].

Sitokiometrisi düzgün (Ca/P=1,67), homojen, benzer kristal yapıya sahip nano taneli HA tozlarının daha kolay sinterlenebildiği görülmektedir. Genelde mikron boyutunda taneciklere sahip HA'lar için uygun sinterleme sıcaklığı 1100°C'dir [2,30,34].

Malzemelerin tane boyutlarını hesaplamak için genellikle mikroskopik metotlar kullanılmaktadır. Metallerin tane boyutlarının ölçümünde genellikle ışık mikroskopu yeterli olmaktadır. Ancak HA gibi seramiklerin tane boyutlarının ölçümünde ise genellikle taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılmaktadır. Ayrıca X-ışını kırınımı (XRD) spektrumlarında oluşan tepeciklerin kullanılması ile, Scherrer formülü kullanılarak tanecik boyutları hesaplanabilmektedir.

Geleneksel HA'lar genellikle 1100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sinterlenmeleri neticesinde Reaksiyon 2.1'de gösterildiği gibi ikincil fazlara (kalsiyum oksit ve TCP) ayrılmaya başlarlar:



Homojenliği, özdeş kristal yapısı ve sitokiometrisi sağlanmış nano taneli HA'lar 1300°C'ye kadar olan sıcaklıklarda sinterlenmeleri neticesinde bozunmadan kararlı bir şekilde kalmaktadır [37]. Böylelikle yoğunluğu teorik yoğunluğa yakın malzemeler elde edilebilir.

2.3.1. Hidroksiapatit'in İç Yapısı

HA hegzagonal yada monoklinik olmak üzere iki adet farklı kristal yapıya sahip olabilir. Hegzagonal HA, P₆/m uzay grubuna dahildir ve her bir birim kafeste iki adet formül mevcuttur ayrıca hegzagonal kafes parametreleri ise a=b=9.4225 Å ve c=6.8850 Å boyutlarındadır [38]. HA yapısında bulunan atomların pozisyonları ve birim kafes hücrede bulunan ilgili atom sayıları Tablo 2.1'de sunulmuştur.

Monoklinik kristal yapısına sahip HA ise P₂/b uzay grubuna aittir ve kafes parametreleri ise a=9.4114 Å, b~2a ve c=6.8814 Å olarak hesaplanmıştır. Bu kristal yapıya sahip HA üretilmesi oldukça zor olup %100'e yakın sitokiyometrik HA üretilmesi durumunda ve yüksek sıcaklıklarda kalsine edilmesi neticesinde oluşabilir [40]. Hegzagonal ve monoklinik HA arasındaki esas fark ise hidroksil iyonlarının sıralanış şeklidir. Monoklinik HA'da hidroksil iyonları O-H, O-H, O-H sırası ile dizilmiş olmasına rağmen hegzagonal HA'daki hidroksil iyonları ise O-H, H-O, O-H, H-O sırası ile dizilmişlerdir [41]. Deneysel çalışmalar neticesinde üretilen HA'ların, kristal yapıları hegzagonal olarak bulunmuştur [18,19].

Tablo 2.1. Hegzagonal HA yapısında bulunan atomların pozisyonları [39].

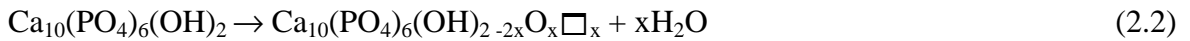
Atom	Birim kafeste bulunan atom sayısı	x	Y	Z
Ca (I)	4	0.333	0.667	0.001
Ca (II)	6	0.246	0.993	0.250
P	6	0.400	0.369	0.250
O(I)	6	0.329	0.484	0.250
O(II)	6	0.589	0.466	0.250
O(III)	12	0.348	0.259	0.073
OH	2	0.000	0.000	0.250

2.3.2. Hidroksiapatitte Faz Dönüşümleri

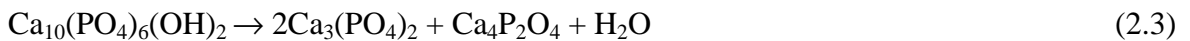
Faz dönüşümleri genellikle HA'nın yüksek sıcaklıklarda sinterlenmesi sırasında gerçekleşir [42]. Tablo 2.2'de HA'da değişik sentez metotlarında değişik sıcaklıklarda meydana gelen faz dönüşümleri gösterilmektedir.

Sol-jel metoduyla sentezlenen HA'da 800°C üzerinde β -TCP ve CaO oluşumu, Reaksiyon 2.1'deki şeklinde olur [46].

Çöktürme metoduyla sentezlenen HA ise 1100°C'de ayrışmaya saatlerce direnir [31]. HA'nin hidrotermal sentezinde, sinterleme sırasında iki reaksiyon olması beklenir:



(\Box : yüksüz boşluk, $x < 1$)



Yukarıdaki çalışmada [45], sinterleme için özel bir nemli ortam hazırlanmamasına rağmen bu iki ayrışma reaksiyonu gerçekleşmedi, bunun havadaki neme bağlı olduğu düşünüldü [45]. Sinterleme sıcaklığına ek olarak sentetik apatitteki kalsiyum eksikliği de faz dönüşümlerine sebep olan bir diğer faktördür [42]. Stokiyometrik HA'nin Ca/P oranı olan 1.67'den sapma da yeni faz oluşumlarını tetikler [21, 42]. Bu çalışmalar sinterleme sıcaklığının, atmosferin ve Ca/P oranının HA faz dönüşümleri açısından önemini göstermektedir.

Tablo 2.2. HA’da değişik sentez metotlarında değişik sıcaklıklarda meydana gelen faz donüşümleri [26, 43-47].

Sentez Metodu	Yeni Oluşan Faz	Oluşma Sıcaklığı
Katı Hal Reaksiyonları	β -Ca ₂ P ₂ O ₇ ve CaP(HPO ₄)(PO ₄) ₅ OH	500°C
	β -TCP	800°C
	α -TCP	1250°C
Mikroemülsiyon	β -TCP	1200°C
Sol-jel Sentezi	β -TCP ve CaO	800°C üzeri
Çöktütme	β -TCP	1300°C üzeri
Hidrotermal Sentez	-	

2.3.3. Hidroksiapatitin Mekanik Özellikleri

HA iyileştirilmiş kimyasal ve biyolojik özelliklerine rağmen yük taşıma gerektiren uygulamalar için mekanik olarak stabil değildir. Buna ek olarak HA’nın mekanik özellikleri kemiğinkilerle uyumlu olmayabilir. Tablo 2.3’de HA ile kemiğin mekanik özellikleri karşılaştırılmaktadır [43, 48]. HA’nın Tablo 2.3’de gösterilen mekanik özellikleri katı hal reaksiyonlarıyla üretilmiş, 135 MPa basınçta soğuk preslenmiş, 1250°C’de iki kere sinterlenmiş HA’ya ait değerlerdir [43]. Bu değerlerin sinterleme sıcaklığı ve presleme basıncı arttıkça arttığı gösterilmiştir [43].

Bir çalışmada hidrotermal metodla üretilen ve 1200°C’de sinterlenen HA’nın bükülme kuvveti 120 MPa olarak bulundu [45]. HA’nın sol-jel metoduyla üretildiği ve 1250°C’de sinterlendiği başka bir çalışmada, bükülme kuvveti basınç geometrisi ve uygulanan yüke bağlı değişerek 58 ila 80 MPa civarında bulundu [49].

Tablo 2.3. HA ve kemiğin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması.

Malzeme	Son Çekme Dayancı (MPa)	Son Basma Dayancı (MPa)	Elastik Modülü (GPa)
Sert Kemik (Uzunlamasına)	133	193	17
Sert Kemik (Enlemesine)	51	33	11.5
Süngerimsi Kemik	3	6	0.961
HA	120	270	20

Ca/P oranları farklı olan HA'ların kıyaslandığı bir çalışmada, stokiyometrik HA yüksek porozite oranına (% 23.2) bağlı olarak en düşük basma dayancını gösterdi (58 MPa). Üç örnek arasında Ca/P oranı 1.65 olan ve porozite oranı % 6.5 olan HA örneği en yüksek basma dayancını (108 MPa) gösterdi. Ca yetersiz olan üçüncü HA örneğinin Ca/P oranı ise 1.58'di. Bu örneğin porozite oranı %10.6, basma dayancı ise 87 MPa'dı. Bu çalışma basma dayancının malzemenin porozitesine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir [50].

Bir başka çalışmada morfolojileri kontrol edilen HA nano-tozları sentezlenmiş ve küresel nano-tozların içine çubuk şeklinde taneciklerin eklenmesinin etkileri incelenmiştir [51]. Çubuk şekilli taneciklerin miktarının artışının mikrosertlikte düşüşe ve kırılma tokluğunda artışa sebep olduğu görülmüştür. Örneklerin SEM fotoğraflarında çubuk şekilli parçacıkların artışıyla porozitede de artış olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem mekanik özelliklerde meydana gelen değişiklikleri şu şekilde açıklar: artan porozite miktarı çatlak büyümesini engelleyerek kırılma tokluğunu artırırken, daha düşük mikrosertlik değerleri elde edilmesine sebep olmaktadır.

Bu çalışmalar HA'nin mekanik özelliklerinin sentez metoduna, ısıl işlem sıcaklığına, poroziteye, mikroyapıya ve malzemenin stokiyometrisine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Bu nedenle detayları daha önce tartışıldığı gibi optimum mekanik özelliklere sahip HA elde etmek için dikkate alınması gereken pek çok değişken vardır.

2.3.4. Hidroksiapatitin Biyolojik Özellikleri

HA biyouyumluluğu oldukça yüksek bir malzemedir. Kemik-implant ara yüzeyinde çok kuvvetli bağlar oluşabilmektedir ve kemiğin bu yüzeyde büyüebilmesini hızlandırmaktadır. Osteoblastların yani genç kemik hücrelerinin biyoaktivitesi yüksek olan bu malzeme üzerindeki tutunumu ve çoğalması diğer biyoseramiklere göre çok daha iyidir. Ayrıca nano HA yüzeyindeki osteoblast hareketleri daha hızlıdır.

Pek çok çalışmada mikron boyutundaki tanelere sahip malzemelere nazaran nano yapıdaki malzemeler üzerindeki osteoblast hareketlerinin daha gelişkin ve fazla olduğu görülmüştür. Osteoblast hücrelerinin fonksiyonları, fibronektin, vitronektin, laminin ve kolajen proteinleri ileri etkileşimleri sayesinde artmaktadır [52, 53]. Webster ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada [32], osteoblast hücrelerinin, nano yapıdaki HA'lar ve diğer önemli biyoseramikler olan titanya ve alümina üzerindeki uzun süreli (günlerden haftalara süren) fonksiyonları gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin her türlü fonksiyonları nano yapıdaki HA'lar üzerinde daha gelişmiş bir şekildedir [32].

HA; fizyolojik pH, sıcaklık ve kompozisyonda kullanılabilir, termodinamik olarak kararlı bir malzemedir [1]. Aynı zamanda kristolografik olarak da kemik mineraline olan benzerliği malzeme üzerinde kemik gelişimini tetikleyici özelliğindedir [54].

HA'nin bir başka uygun özelliği de çözünme hızıdır. İmplantlarda malzemenin kemik gelişimine yardımcı olduktan sonra kemik tarafından rezorbe edilmesi istenen bir özelliktir [21]. Bu özellik kemik ile malzemenin çözünme hızlarının uyuşmasıyla elde edilebilir [21]. Bu HA ve HA'dan çok daha hızlı çözünen TCP bir karışım elde ederek mümkün hale gelebilir [21].

HA üzerindeki hücre yapışması, çoğalması, morfolojisi gibi hücre davranışları da HA'nin biyoaktivitesi açısından önemli parametrelerdir. Bir çalışmada osteoklast benzeri hücrelerin morfolojileri ve resorpsiyon aktiviteleri konvansiyonel ve nano-fazlı HA ve alumina üzerinde incelenmiştir [33]. Bu çalışmada osteoklast benzeri hücrelerin aktiviteleri tartar asidine dayanaklı asit fosfataz (TRAP) sentezleri ve hücrelerin malzeme yüzeylerinde oluşturdukları resorpsiyon çukurları incelenerek gözlenmiştir. Çalışmada 13 günlük bir zaman periyodunda TRAP sentezinin konvansiyonel ve nanofazlı HA üzerinde maksimum olduğu gözlenmiştir. Tüm zaman periyotlarında daha yüksek TRAP sentezi ise en yükseği nano fazlı HA olmak üzere nano fazlı malzemelerde gözlenmiştir. Resorpsiyon çukuru oluşumunda hem konvansiyonel hem de nano fazlı HA kemik bazlı malzemeye benzer davranış gösterirken, en yüksek resorpsiyon aktivitesi nano fazlı HA üzerinde gözlenmiştir. Bu çalışma nano fazlı HA

üzerinde osteoklast benzeri hücre aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir, bu da nano fazlı HA yüzeyinin yüksek pürüzlülüğüne, ıslanabilirliğine ve bu malzemenin yüksek çözünürlüğüne bağlanabilir.

Başka bir çalışmada, hücre çoğalması, alkalın fosfataz aktivitesi ve extraselüler matriks kalsiyum konsantrasyonu gibi osteoblast fonksiyonları nano fazlı seramikler ve HA üzerinde incelenmiştir [32]. Gözlenen tüm osteoblast aktiviteleri konvansiyonel HA'ya kıyasla uzun hücre kültürü periyotlarında nano fazlı HA üzerinde daha fazladır.

Bu iki çalışma nanofazlı HA'nın malzeme üzerindeki osteoklast ve osteoblast aktivitelerini artırarak daha iyi biyolojik özellikler sunduğunu göstermektedir. HA'nın biyolojik özelliklerini iyileştirmenin bir diğer yolu da çeşitli elementlerle zenginleştirmektir. Bu konu ileriki bölümlerde ayrıntılı olarak tartışılmaktadır.

2.4. Nano Hidroksiapatit'e Çeşitli İyonların Eklenmesi

Doğal HA'da Mg^{2+} , F^- , CO_3^{2-} gibi pek çok sayıda iyonlar yer almaktadır [55]. Bu yüzden HA'ya pek çok değişik elementler eklenerek çeşitli araştırmalar yapılagelmektedir. İç yapısal, mekanik özellikler, biyouyumluluk ve biyoaktivite özellikleri yönünden çok daha faydalı ürünler geliştirebilmek için farklı iyonlar saf HA'nın iç yapısına eklenebilir.

Kemik mineralinin yapısında birçok değişik element mevcuttur. Ayrıca HA'nın yük taşıma gerektiren uygulamalar için mekanik özelliklerinin zayıf olduğu gösterilmiştir. Bu nedenlerle, HA'nun mekanik özelliklerini değiştirmek ve kemik mineraline olan benzerliğini artırmak için, HA çeşitli elementlerle zenginleştirilmektedir.

Bu iyonlardan bazıları Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , F^- , Y^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{4+} , Cl^- , As^{3-} , V^{5+} , La^{3+} , In^{3+} ve Bi^{3+} 'tur [40, 56-58]. HA'nın kimyasal formülünün; $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$ olduğu düşünülerek her element için uygun olan elemental konum Tablo 2.4'de gösterilmektedir.

Tablo 2.4. HA'ya eklenen elementlerin HA yapısındaki konumları.

Uygun Konum	Eklenen Element
Ca	Mg, Zn, Y, In, Na, K, Sr, Pb, Cd, Ba, Bi, Cu
P	As, V
OH	F, Cl

2.4.1. İyon Eklenmiş Nano Hidroksiapatit'lerin İç Yapı Özellikleri

HA'ya element eklenmesi latis parametrelerde, HA'nın yapısında veya çözünürlüğünde hegzagonal simetrisini etkilemeden değişikliklere sebep olabilir [59]. Eğer eklenen element yerine geçtiği elementle aynı hegzagonal yapıya sahipse, HA yapısına uyum sağlar. Fakat, iyon boyutuna bağlı olarak, eklenen elementler HA yapısında genişleme veya daralmaya yol açabilir [60]. Tablo 2.5'te eklenen bazı elementlerin iyonik yarıçapları

Tablo 2.5. Bazı elementlerin iyonik yarıçapları ve HA'nın latis parametreleri ve kristalinitesi üzerindeki etkileri.

Yerine Geçen İyonik Element	Yarıçap (Å)	Latis Parametreler		Kristalinite
		a-ekseni	c-ekseni	
Ca²⁺ için	0.99	9.348	6.882	
Sr ²⁺	1.12	artış	artış	değişim yok
Ba ²⁺	1.34	artış	artış	düşüş
Pb ⁺	1.20	artış	artış	düşüş
K ⁺	1.33	değişim yok	değişim yok	değişim yok
Na ⁺	0.97	değişim yok	değişim yok	değişim yok
Li ⁺	0.68	değişim yok	değişim yok	değişim yok
Mg ²⁺	0.66	düşüş**	düşüş **	düşüş **
Cd ²⁺	0.97	düşüş	düşüş	düşüş
Mn ²⁺	0.80	düşüş	düşüş	düşüş
Zn ²⁺	0.74	artış **	artış **	düşüş **
Al ³⁺	0.51	artış	artış	düşüş
OH⁻ için	1.34			
F ⁻	1.36	düşüş	değişim yok	artış
Cl ⁻	1.81	artış	düşüş	değişim yok

** TCP oluşumu [59].

HA içerisine çok farklı iyonlar eklenebilir. Bu iyonların eklenmesi neticesinde HA'nın iç yapısında değişiklikler meydana gelebilir. Özellikle HA'nın hegzagonal kafes parametrelerinde değişiklikler meydana gelebilir. Ayrıca farklı iyonların ilave edilmesi neticesinde HA'ların daha ufak tane boyutunda üretilebilecekleri deneysel olarak

gösterilmiştir [18]. Çeşitli iyonların HA'nın iç yapısına olan etkileri Tablo 2.6'de sunulmuştur.

Tablo 2.6. Çeşitli iyonlar eklenmiş farklı HA'ların iç yapı özellikleri [18,56,57,61].

Malzeme	Sinterleme koşulları	Yoğunluk (g/cm ³)	Hegzagonal iç yapı				Tane boyutu (µm)
			a* (Å)	c* (Å)	Hacim (Å ³)	ΔHacim (Å ³)	
saf HA	1100°C'de 1-saat	3.125	9.427	6.8878	1590.2	0	0.56
%2 Mg	1100°C'de 1-saat	3.162	9.3938	6.8758	1570.9	-19.3	0.27
%5 Y	1100°C'de 1- saat	3.269	9.388	6.8662	1566.7	-23.5	0.29
Saf HA	1100°C'de 1saat	-	8.9594	6.8103	1420.3	0	1.12
%5Y	1100°C'de 1-saat	-	8.9013	6.8548	1411.1	-9.21	0.71
Saf HA	1100°C'de 1-saat	3.115	9.4264	6.8884	1584.7	0	0.26
%5 Al	1100°C'de 1-saat	2.8846	9.4252	6.892	1585.1	0.4	0.59
%5 Al	1300 C'de 1-saat	3.1465	9.4136	6.9013	1583.3	-1.3	1.59
Saf HA	1200 C'de 4-saat	-	9.413	6.875	1577.1	0	-
%2 Si	1200 C'de 4-saat	-	9.416	6.902	1584.3	7.2	-

Bir çalışmada [56], Mg²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ ve Y³⁺ iyonlarıyla zenginleştirilen HA'nın yapısal özellikleri incelendi. Bu iyonların eklenmesi sonucu herhangi bir ikincil faz oluşmadığı gözlemlendi. Latis parametler 'a' ve 'c'nin her ikisinde de düşüş görüldü, iyon eklenen örneklerin hegzagonal latis hacminde küçülme gözlemlendi. Bu küçülmenin eklenen iyonların iyon yarıçaplarının Ca²⁺ iyonununkine göre daha küçük olması sebebiyle normal olduğu düşünüldü. Cd²⁺ iyonu eklenen örnek dışında iyon eklenen örneklerin hepsinin tanecik boyutları saf HA'ninkilere kıyasla daha küçük bulundu. Bu çalışma bu iyonların HA yapısına katı çözeltide dahil olduğunu gösterdi. HA yapısında iki değerlikli Mg²⁺, Cd²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarının Ca²⁺ iyonu yerine geçtiği bilinmektedir. Bu çalışma üç değerlikli Y³⁺ iyonunun da Ca²⁺ iyonu yerine geçebileceği varsayımını öne sürmüştür. Bu çalışmanın Y³⁺ iyonu ile ilgili kısmı daha ayrıntılı olarak bir sonraki bölümde tartışılmaktadır.

Başka bir çalışmada [61], HA'ya Mg²⁺ and Si⁴⁺ iyonları eklenmesinin etkileri araştırıldı. Bu çalışmada Si⁴⁺ iyonları P⁵⁺ iyonları ile yer değiştirildi, bu da Si⁴⁺ iyonlarının iyon çapının daha büyük olması nedeniyle latis parametlerde artışa sebep oldu. Diğer taraftan

Ca²⁺ iyonlarının Mg²⁺ iyonlarıyla yer değiştirmesi Mg²⁺ iyonlarının görece küçük iyonik çapı nedeniyle latis sabitlerinde düşüşe sebep oldu. Mg²⁺ ve Si⁴⁺ iyonlarının HA'ya birlikte katılması ise HA'nın latis sabitlerinde genel bir düşüşe sebep oldu, bu da bu iyonların HA'ya yapısal olarak dahil olduğunu kanıtladı. Bu çalışmada HA örneklerine Si⁴⁺ iyonları tek başına ve Mg²⁺ iyonlarıyla birlikte eklendi. Sadece Si⁴⁺ iyonları eklenen örnekler kütlece % 1.97 Si eklendiğinde 1200°C'ye kadar termal olarak kararlı bir davranış sergiledi. Her iki iyonun da eklendiği örnekler her elementin kütlece %1 eklendiği bir kompozisyonda 1200°C'ye kadar termal kararlılığını korudu. Si eklenen örneklerin kütlece % 1.97 iyon eklendiğinde tek fazlı HA taneciklerinden oluştuğu görüldü. İki iyon eklenen örneklerde Mg eklenmesinin HA'da kararsızlığa sebep olduğü ve kütlece % 1.05'lik bir eklenme düzeyinde Si iyonlarının yapıya dahil olmasını zorlaştırdığı bulundu. Hücre çoğalması deneylerinde hem sadece Si⁴⁺ iyonları eklenen örnekler hem de her iki iyonun eklendiği örnekler biyouyumluluk gösterdi.

Saf nano HA'ya Al³⁺ katyonu eklenerek bu malzemenin iç yapı ve sinterleme özellikleri araştırılmıştır [18]. % 2.5, 5 ve 7.5 mol oranlarında HA'ya eklenen bu katyonla 1100°C ve 1300°C'lerde yapılan sinterleme işlemleri neticesinde ikincil fazların oluştuğu gözlemlenmiştir. Al³⁺ katyonunun eklenmesi HA'nın bozunmasını ve TCP ile CaO'nun oluşumunu hızlandırmaktadır. İkincil fazların oluşumunu engelleyebilmek için Al³⁺ iyonunun molca %5'ten fazla olmaması gerektiği anlaşılmıştır. Al³⁺ iyonunun çapı Ca²⁺ iyonunun çapından çok daha küçük olduğundan dolayı da hegzagonal birim hücresinin hacmi azalmıştır. 1300°C'de sinterlenen Al³⁺ iyonu eklenmiş HA'nın tane boyutunun da saf HA'dan daha düşük olduğü görülmüştür [18].

Bu malzemeye çeşitli katyonlar ekleme çalışmaları sadece katyonların teker teker eklenmesiyle sınırlı kalmayıp aynı anda birden çok katyon da eklenmiştir. Kim ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise HA'ya aynı anda hem silisyum hem de magnezyum elementleri eklenmiş, sinterlenme özellikleri, morfolojileri ve biyolojik özellikleri incelenmiştir [61].

Bir başka çalışmada HA'ya bünyesinde bulunan Ca²⁺ iyonu ile yer değiştirmesi için ZrO²⁺ eklenmiştir [19]. Sinterlenen malzemenin gözenekli yapısı eklenen katyon miktarı arttıkça artmakta olduğü görülmüştür. Ayrıca HA'nın bozunmasını da hızlandıran bir etkiye sahiptir. Ca²⁺ ve ZrO²⁺ iyonlarının yer değiştirmesi neticesinde HA'nın hegzagonal kafes parametrelerinde artışlar meydana gelmiştir ve bu artışlar nedeniyle de oluşan gerilimler HA'nın bozunma hızını arttırmıştır. Bozunma esnasında oluşan su molekülleri de malzemenin yapısında gözeneklerin artmasına neden olmuştur. Böylelikle ZrO²⁺ eklenmiş HA'lar saf HA'dan daha gözenekli bir yapıya sahip olmuşlardır.

Bir başka çalışmada ise F^- ve Cl^- anyonları aynı anda eklenmiştir [62]. Apatit yapısı değişmemekle birlikte kafes parametrelerinde artış görülmüştür. Çeşitli oranlarda katılan bu anyonlarla hazırlanan HA'ların hepsinde tane boyutunun 50 nm'den küçük olduğu gözlemlenmiştir. Bu da doğal kemiğin tane boyutu ile bir uyum yakalandığını göstermektedir.

2.4.2. İyon Eklenmiş Nano Hidroksiapatit'lerin Biyolojik Özellikleri

Ergun ve ark. [56] HA'ya Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} ve Y^{3+} iyonlarını eklemiştir. Bu iyonların eklendiği HA'ların kafes parametrelerinde değişiklikler ortaya çıkmıştır. HA'ya eklenen bu elementler Ca katyonunun yerini aldıklarında malzemenin hegzagonal hücre hacminin azaldığı gözlemlenmiştir. Osteoblast hücrelerinin Y^{3+} eklenmiş HA'lara yapışmasının saf HA'ya yapışmasından daha fazla olduğu görülmüştür.

Ag^+ iyonlarının HA'nın antibakteriyel özelliklerini iyileştirdiği bilinmektedir [63]. Ayrıca, Cu^{2+} iyonlarının HA'nın antibakteriyel özelliklerine katkısı araştırılmıştır [63]. Cu^{2+} iyonları ilave edilmiş HA'nın E.coli'ye karşı kuvvetli bir antibakteriyel özelliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir [64]. Ayrıca, Ag^+ ve Cu^{2+} iyonlarının beraber olarak ilave edilmesi neticesinde hidroksiapatite antibakteriyel özellikler kazandırılmıştır [65]. Antibakteriyel özellikleri gösteren iki önemli faktör vardır [64]. Birincisi elektrostatik çekim sayesinde bakteriler Cu^{2+} iyonları ilave edilmiş HA'nın yüzeyine yapışmaya başlarlar. İkincisi ise Cu^{2+} iyonları yavaş yavaş ortama yayılır ve ortamda yerleşik düzene geçmeleri sonucunda bakterileri yok eder [64]. Ayrıca Ag ilave edilmiş HA'lara göre daha ekonomik ve mikroyapı ve kimyasal yönlerden daha iyi özelliklere sahiptirler [64, 66].

Webster ve ark. [57] +2 ve +3 değerlere sahip Mg^{2+} , Zn^{2+} , La^{3+} , Y^{3+} , In^{3+} ve Bi^{3+} iyonları HA'ya eklemiş ve bu malzemeler üzerinde hücre çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada osteoblast hücrelerinin farklı iyonlar eklenmiş HA üzerindeki tutunumlarının hangi derecelerde değiştiğine bakılmıştır. Örneğin Y^{3+} eklenen HA'larda bu hücrelerin yapışma oranları 3000 hücre/cm^2 olduğu görülmüştür. Bu sonuç saf HA'daki değer yaklaşık iki katıdır. Ayrıca osteoblast hücreleri, üç değerlikli katyonlar eklenmiş HA'lara, iki değerlikli katyonlar eklenmiş HA'lara göre daha hızlı ve çok yapışmışlardır. İki değerlikli katyonlar eklenmiş HA'daki yapışma miktarı 2200 hücre/cm^2 iken üç değerlikli katyonlar eklenmiş HA'da bu oran 2600 hücre/cm^2 değerlerine çıktığı görülmüştür. Bu çalışmada ortaya çıkan en çarpıcı sonuç ise Bi^{3+} katyonunun gelecek vadede bir element olduğunun belirtilmesidir. Çünkü diğer bütün katyonlar arasında HA'nın kemik implant uygulamalarında kullanılabilmesi için gerekli özelliklerini en verimli şekilde arttıran bu katyon olmuştur.

Ayrıca zaten bu katyon vücut içerisinde doğal olarak da bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında, gelecekte Bi^{3+} katyonu eklenmiş HA'lar konusunda araştırmalar artabilir. Ancak Bi^{3+} katyonu eklenmiş HA'ların mekanik özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir.

2.4.3. İyon Eklenmiş Nano Hidroksiapatit'lerin Mekanik Özellikleri

Nano taneli HA'ya Mg^{2+} ve Zn^{2+} katyonlarının eklenmeleri işlemi daha sonra başka çalışmalara da konu olmuştur. Kalita ve ark. metal iyonlarının HA'nın morfolojik ve sinterleme özellikleri üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile nano yapıdaki HA'ya Mg^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarını eklemiştir [67]. Ağırlıkça %1 oranında magnezyum eklenmiş HA'ların tane boyutlarının saf HA'ya göre daha düşük olduğu gözlemlenmişken, aynı oranda çinko eklenmiş HA'ların tane boyutları artmıştır.

1300°C'de sinterlenmiş ve %1 oranında metal iyonları eklenmiş HA sertlik ve basma dayanımları bakımından da saf HA'ya göre daha yüksek seviyelerdedir. Vickers sertliklerine bakıldığında saf HA'nın sertliği 325 HV civarında iken, %1 oranında Mg^{2+} katyonu eklenmiş HA'nınki yaklaşık 380 HV, Zn^{2+} eklenmiş HA'nınki ise 350 HV civarında olduğu görülmektedir [67]. Yapılan basma testleri sonucunda saf HA'nın basma kuvveti 211 MPa bulunurken, Mg^{2+} eklenen HA'nın 281 MPa, Zn^{2+} eklenen HA'nın 223 MPa basma kuvvetine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca biyolojik özellikler bakımından da incelemeler yapılmış ve bozunma (kütle kaybı) hızlarının metal iyonu katılmış malzemede daha düşük olduğu ortaya çıkmıştır, özellikle magnezyum eklenen HA'da en düşük bozunma hızı saptanmıştır.

HA'ya sadece katyonlar eklenmemiştir. Bu malzemenin özelliklerini geliştirmek adına anyonlar da eklenmiştir. F^- eklenmiş HA'lar yüksek sıcaklıklardaki sinterlemeye karşı daha dayanıklıdır. Örneğin HA'nın korozyona karşı direncini artırabilmek için değişen oranlarda F^- anyonları eklenmiştir [68]. OH^- anyonu ile yer değiştiren bu katyonlar malzemenin kafes parametrelerinden sadece birini değiştirerek HA'nın kristalliliğini ve kararlılığını arttırmışlardır.

Hem saf HA hem de flor eklenmiş HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{F}_{2x}$) nano tane boyutlarında üretilmişlerdir [68]. Flor eklenmiş HA'nın (FHA) formülündeki x değerleri sıfır ile 1 arasında değişen muhtelif değerlerdir. 0, 0,2, 0,4 ve 0,6 değerlerine sahip HA'larda yapılan mikro-Vickers sertlik testleri sonucunda x'in sıfır olduğu malzemenin yani saf HA'nın mikro-Vickers sertliği 5,81 GPa olarak hesaplanmıştır. Diğer x değerleri içinde

sırasıyla 6,03, 5,97 ve 6,1 GPa değerleri bulunmuştur. FHA'nın, HA'ya göre, hem mikro sertliği artmış hem de, buna bağlı olarak, korozyon direnci artmıştır.

2.4.4. Hidroksiapatitin İttriyum ile Zenginleştirilmesi

HA'ya eklenen birçok element arasında, HA'ya ittriyum eklenmesi konusunda sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Y^{3+} üç değerlikli bir iyon olmasına rağmen, daha önce bahsedilen çalışmalarda [56, 57] belirtildiği gibi iki değerlikli Ca^{2+} iyonunun yerine geçer. Y^{3+} iyonunun eklenmesi sonucu açığa çıkan fazla pozitif yükün, her ittriyum iyonu için bir kalsiyum iyonu boşluğu ile telafi edildiği varsayımı öne sürüldü. Aynı çalışmada Y^{3+} iyonu miktarının artmasının HA örneklerinde toplam hacimdeki poroziteyi de artırdığı gösterildi. Bu çalışmada HA içindeki Y^{3+} çözünürlüğü %7'den büyük bulundu. Çözünmemiş Y^{3+} , un ise HA yüzeyinde biriktiği, bunun da yüzeyde protein tutulması için olanak sağladığı düşünüldü.

Bu görüş Y^{3+} iyonu eklenen HA örnekleri üzerinde protein tutunmasının gözlemlendiği takip eden çalışmada desteklendi [69]. Bu çalışmada vitronektin ve kolajen proteinlerinin iyon eklenmemiş ve eklenmiş HA örnekleri üzerindeki tutunma davranışları karşılaştırıldı. Y^{3+} iyonu eklenen örneklere daha büyük miktarda vitronektin ve kolajen proteinlerinin tutulduğu, bunun da örnek yüzeylerine osteoblast yapışmasını kolaylaştırıldığı bulundu. Bu bulgu Y^{3+} iyonu eklenen HA'nın osteoblast yapışması için saf ve diğer iyonlarla zenginleştirilen HA'ya göre daha uygun bir ortam sağladığını gösterdi. Y^{3+} iyonu eklenen HA'nın daha yüksek kalsiyum tutunması göstermesi ise Y^{3+} iyonunun diğer iyonlara göre daha farklı bir yük durumunun olmasına ve yüzeyde biriken Y^{3+} iyonlarının pürüzlü bir yüzey oluşturmasına bağlandı.

Başka bir çalışmada [70], titanium üzerindeki HA kaplamalarının özellikleri osteoblast fonksiyonları açısından incelendi. Kaplamalar saf ve Y^{3+} iyonu eklenmiş ve nano kristallerden oluşan HA tozlarından elde edildi. Bu çalışmanın bulguları Y^{3+} iyonu eklenen HA kaplamalarında osteoblastların kalsiyum salımının daha fazla olduğunu daha önceki çalışma ile örtüşen bir biçimde gösterdi [69].

Bir çalışmada [47], Y^{3+} ve F^- iyonları eklenen nano HA'nın yapısal, mekanik ve biyouyumluluk özellikleri incelendi. Yapısal incelemeler iyon ekleme miktarının artmasının görece yoğunlukta azalmaya sebep olduğunu, bunun da sinterleme sıcaklığının artırılarak telafi edilebileceğini gösterdi. Fakat artan sinterleme sıcaklıkları ve Y^{3+} ekleme miktarının ikincil faz oluşumuna sebep olduğu görüldü. Mikroyapısal incelemelerde HA'ya Y^{3+} ve F^- eklenmesinin latis parametrelerde, birim hücre hacminde ve tanecik boyutlarında düşüşe

sebebi olduğu sonucuna varıldı. Mekanik testler iyon eklenen örneklerin eklenmeyen örneklerle göre diyametral kuvvetlerinin daha yüksek olduğunu gösterdi. Mikrosertlik değerleri iyon ekleme miktarı ve sinterleme sıcaklığına bağlı değişiklikler gösterdi. Biyouyumluluk incelemelerinde iyon eklenen örnekler daha iyi hücre yapışma verimliliği gösterdi. Hücre yayılma testlerinde, iyon ekleme miktarına ek olarak sinterleme sıcaklığının da hücre yayılmasını etkilediği görüldü. Optimum mekanik ve mikroyapısal özellikleri elde etmek için iyon ekleme miktarı ve sinterleme sıcaklığında çeşitli sınırlamalar uygulanması gerektiği görüldü. Bu çalışmada biyouyumluluk, mikroyapı ve mikrosertlik açısından en iyi özellikleri gösteren malzemenin 2.5 % Y^{3+} ve 2.5 % F^- eklenen ve 1100°C’de sinterlenen HA olduğu görüldü. Bu çalışmalar HA’ya Y^{3+} iyonu eklenmesinin önemini özellikle biyouyumluluk açısından gösterdi.

2.4.5. Hidroksiapatitin Flor ile Zenginleştirilmesi

Tablo 2.4’de gösterildiği gibi HA’nın yapısında F^- iyonları OH^- iyonları yerine geçer. Eğer OH^- iyonları F^- iyonlarıyla kısmen yer değiştiriyorsa, elde edilen malzemeye FHA ($Ca_5(PO_4)_3(OH)_{1-x}F_x$ $0 \leq x \leq 1$) ismi verilir. Eğer OH^- iyonları F^- iyonlarıyla tamamen yer değiştiriyorsa, elde edilen malzemeye floraapatit (FA; $Ca_5(PO_4)_3F$) ismi verilir [71, 72]. HA’nın içindeki F^- miktarını kontrol etmek oldukça önemlidir çünkü kemik oluşumu üzerindeki olumlu etkileri ve HA’nın mekanik özelliklerini iyileştirebilme özelliklerine rağmen, fazla miktarda F^- ’nin kemik üzerinde osteomalasi veya osteo-kondüktiviteyi azaltma gibi olumsuz etkileri olabilir [71-73].

Bir çalışmada [71], ıslak kimyasal teknik ile nano HA, FHA ve FA üretildi ve üretilen malzemeler mekanik ve biyolojik olarak test edildi. XRD analizinde, 1200°C’lik sinterleme sıcaklığına kadar hiçbir örnekte ikincil faz oluşumuna rastlanmadı. FTIR sonuçları OH^- iyonlarının F^- iyonlarıyla yer değiştirdiğini doğruladı. TEM analizinde artan F^- miktarıyla latis parametrelerin düştüğü gözlemlendi. Bu çalışmanın in vitro deneyleri HA’daki F^- miktarı artışının hücre davranışını iki şekilde etkileyebileceğini gösterdi: yüksek F^- miktarı HA üzerine hücre yapışmasını teşvik ederken F^- miktarı artışı sebebiyle Ca^{+2} iyon salımında meydana gelen düşüş hücre yayılmasını engelledi.

Bir başka çalışmada [72], FHA’dan F^- salınmasının biyolojik etkileri incelendi. pH-döngüsü metoduyla farklı F^- miktarlarına sahip FHA örnekleri üretildi. FHA diskleri üzerine hücre yapışması temas açısı testleri ve hücre kültürü deneyleriyle test edildi. Temas açısı çalışmalarında F^- miktarı yüksek olan disklerin temas açılarının daha küçük olduğu, bu

sebeple daha az protein tutulumu olduğu bulundu. Bu da protein tutulumu için konum sağlayan OH⁻ iyonlarının uzaklaşmasıyla açıklandı. Fakat hücre kültürü çalışmalarında ilk 2 saatte benzer sonuçlar elde edilmesine rağmen, daha sonraki gözlemler hücre kültürü süresi arttıkça FHA disklerine saf HA disklerine göre daha fazla hücre yapıştığını gösterdi. Bu sonuçlar artan hücre kültürü süresi süresiyle hücre kültürü medyumuna daha fazla F⁻ iyonu salındığını, bunun da hücre yapışmasını teşvik ettiğini gösterdi. Hücre yayılması çalışmalarında da artan F⁻ miktarının hücre yayılmasını tetiklediği bulundu.

Bir çalışmada [74], hidroksil gruplarının %0, %20, %40, %60, %80 and %100 oranlarında F⁻ iyonlarıyla yer değiştirdiği hidroksiflorapatit-hidroksiapatitlerin mekanik özellikleri incelendi. Malzemelerin sertlik, elastik modül, kırılma tokluğu ve kırılma dayanıklılığı mikro-indentasyon ile ölçüldü. Sertlik ölçümlerinde %80 F⁻ eklenmiş HA'ya kadar bir değişiklik gözlenmedi, fakat bu kompozisyondan sonra hızlı bir artış gözlemlendi. Artan F⁻ miktarıyla elastik modülde lineer bir artış görüldü. Kırılma tokluğu % 60 iyon eklenmesine kadar artarken bu kompozisyondan sonra kırılma tokluğunda düşüş görüldü. En düşük kırılma dayanıklılığı değeri %60 F⁻ içeren örneklerde görüldü ve bu değer %60 F⁻'dan sonra artışa geçti. Bu çalışma belli bir miktarda F eklenmesinin HA'nin mekanik özelliklerini iyileştirdiğini fakat yüksek F miktarlarının mekanik davranışlarda ters etkiler yaratabileceğini gösterdi. Bu nedenle optimum mekanik özellikler için iyon eklenen HA'ların F miktarı belli bir değer geçmemelidir. HA'ya F⁻ eklenmesini araştıran bu çalışmalar, F⁻ iyonu optimum değerlerde eklendiği sürece HA'ya F⁻ eklenmesinin HA'nın hem mekanik hem biyolojik özelliklerini iyileştirebileceğini gösterdi.

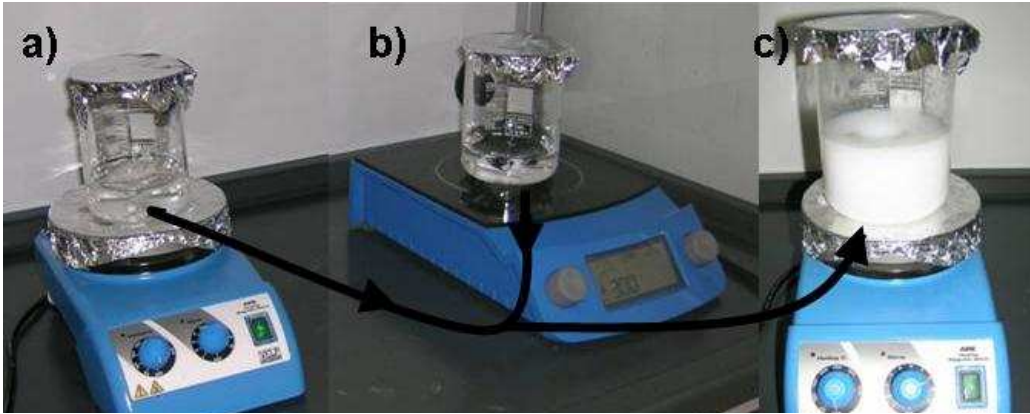
Bu projede nano boyuttaki HA'ya çeşitli oranlarda itriyum ve flor iyonları eklenerek iç yapı, mekanik ve biyolojik özelliklerinin incelenmiştir. Biyoseramikler çöktürme metodu ile sentezlenmiş ve 900°C, 1100°C ve 1300°C'de 1'er saat sinterlenmişlerdir. İç-yapılarını incelemek için XRD, FTIR (ve Raman) spektroskopisi ve SEM metodları kullanılmıştır. Soğuk presle hazırlanan ve sinterlenen disklerin mekanik özellikleri (mikro-sertlik, kırılma tokluğu ve diyametral mukavemet testi) incelenmiştir. Saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin biyoyumlulukları sitotoksikite çalışmaları ile yapılmıştır. Hücre yapışması ve çoğalması MTT canlılık testi ve taramalı elektron mikroskopisi ile, hücrelerin kemik yönüne farklılaşmaları hücrelerin ürettikleri ALP miktarlarının kolorimetrik enzim kinetik çalışmaları ile ve osteokalsein ve osteopontin üretimleri immunohistokimyasal yöntemlerle çalışılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Malzemelerin Üretilmesi

3.1.1. Nano-hidroksiapatit Üretilmesi

Yapılan literatür araştırması sonucunda elde edilen veriler ile nano-HA üretmek için gerekli olan deney düzeneği kurulmuştur. HA'nın üretilmesi için çöktürme metodu kullanılmıştır. Bu yöntemde, sitokiyometrik HA elde etmek için, önce 0.5 M kalsiyum nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Şekil 3.1a) ve 0.3 M di-amonyum fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) (Şekil 3.1b) saf suda ayrı ayrı çözdürüldü. Her iki solüsyona da amonyum hidroksit (NH_4OH) eklenerek pH değeri 11-12 yapıldı. Daha sonra sürekli karıştırılan amonyum fosfat solüsyonunun içerisine kalsiyum nitrat solüsyonu damla damla eklendi ve ayrıca amonyum hidroksit eklenerek çözeltinin pH değeri 11-12'ye getirildi. Amonyum hidroksitin eklenme sebebi ise ortamı bazikleştirip HA'nın çökmesini sağlamaktır. Hazırlanan bu solüsyon oda sıcaklığında bir gün boyunca karıştırıldı (Şekil 3.1c). Sonra solüsyon birkaç kez yıkandıktan sonra ufak gözenekli filtre kağıdı kullanılarak süzme işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.2a). Sıvı kısmı tamamen gittikten sonra beyaz bir keke benzeyen ıslak malzeme elde edildi. Süzölmüş olan ıslak kek 90°C 'de fırında kurutuldu. Son olarak, kurutulan kek 900°C , 1100°C ve 1300°C 'de 1 saat sinterlendi (Şekil 3.2b) ve sinterlenen malzeme ısıtma ve soğutma işlemi sırasında fırın içerisinde bekletildi.



Şekil 3.1. HA'nın çöktürme metodu ile üretimi: **a)** 0.5 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 'ın saf suda çözdürülmesi; **b)** 0.3M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 'ın saf suda çözdürülmesi; **c)** $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltilerinin pH 11-12'de karıştırılmaları sonucunda oluşan HA'nın oda sıcaklığında karışımı.

3.1.2. Y⁺³ ve F⁻ Eklenmiş HA'ların Üretimi

Saf HA'nın üretiminde kullanılan aynı yöntemle Y ve F eklenmiş HA'lar elde edilmiştir. Y⁺³ iyonunu eklemek için yitriyum nitrat tetra hidrat (YNO₃·6H₂O) tuzu, F⁻ iyonunu eklemek içinse amonyum florür (NH₄F) kullanılmıştır. Yitriyum nitrattan %2,5, %5 ve %7,5 kompozisyonlarından eklediğimiz zaman, başlangıç tuzu olarak kullanılan Ca(NO₃)₂·4H₂O tuzundan da aynı miktarda azaltılarak HA'nın sitokiyometrisi sabit tutulmuştur. Kullanılan amonyum florür miktarı ise bütün kompozisyonlarda % 2,5 olarak alınmıştır.

Bu tuzlar kullanılarak yine ilk bölümdeki gibi saf su kullanılarak solüsyonlar hazırlanmış, belli bir süre karıştırıldıktan sonra pH seviyesini de 11–12 civarında ayarlayabilmek için amonyum hidroksit çözeltisi eklenerek iki solüsyon birbirine karıştırılmıştır. İlk solüsyon kalsiyum nitrat ve yitriyum nitrat tuzları kullanılarak hazırlanmıştır. Diğer solüsyon da di-amonyum hidrojen fosfat ve amonyum florür yıkandıktan sonra ufak gözenekli filtre kağıdı kullanılarak süzme işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2a). Daha sonra yapılan işlemler ise saf HA üretmek için yapılan işlemler ile aynıdır. Bu çalışmada üretilen malzemelerin bu rapor boyunca kullanılacak olan kısa gösterimleri Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Saf hidroksiapatitin ve Y⁺³ ve F⁻ eklenmiş hidroksiapatitlerin kısa gösterimleri.

Kısaltma	Açıklama
HA	Saf HA
2.5YFHA	2.5% Y ⁺³ -2.5% F ⁻ -HA
5YFHA	5% Y ⁺³ -2.5% F ⁻ -HA
7.5YFHA	7.5% Y ⁺³ -2.5% F ⁻ -HA

3.2. Karakterizasyon Metodları

3.2.1. Malzemelerin Yoğunluklarının Ölçülmesi

Sinterlenen malzemelerin yoğunluklarını ölçmek için Arşimed metodu kullanılmıştır (Formül-3.1). Sinterlendikten sonra elde edilen malzemenin düzgün bir geometrisi olmadığından dolayı Arşimed metodu kullanılmıştır:

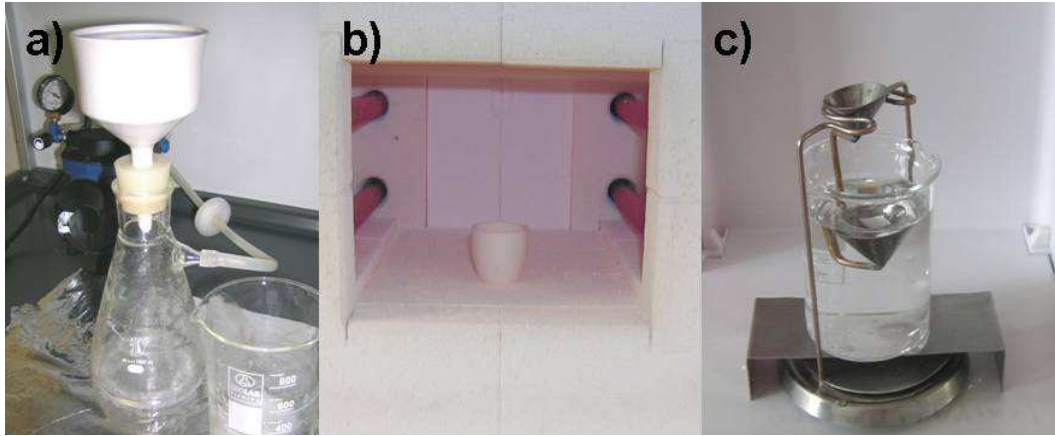
$$\text{Yoğunluk (g/cm}^3\text{)} = \frac{W_{t_{hava}}}{(W_{t_{hava}} - W_{t_{su}})} \times \rho_{su} \quad (3.1)$$

$W_{t_{hava}}$ = havadaki ağırlık;

$W_{t_{su}}$ = sudaki ağırlık;

ρ_{su} = suyun yoğunluğu.

Sudaki ağırlığı ölçmek için Şekil 3.2c’de görünen deney düzeneği kullanılmıştır. Bu metotta, malzemenin hem su içerisindeki hem de havadaki ağırlıkları ölçüldükten sonra aşağıdaki formül kullanılarak yoğunluğu hesaplanmıştır. HA’nın teorik yoğunluğu 3.156 g/cm^3 alınmıştır.



Şekil 3.2. a) HA çözeltisinin filtrelenmesi; b) Kurutulmuş HA’nın 1100°C ’de sinterlenmesi; c) Arşimed formülünde kullanmak için sinterlenmiş HA’nın su içerisinde ağırlığının hassas terazide ölçülmesi.

3.2.2. X-ışınları Difraksiyonu Metodu ile Malzemelerin İç Yapılarının İncelenmesi

900°C , 1100°C ve 1300°C ’lerde sinterlenmiş farklı kompozisyonlardaki HA’ların iç yapılarının belirlenebilmesi için XRD metodu kullanılmıştır. Öncelikle malzemeyi karakterize etmek için sinterlenmiş malzeme toz haline getirildi. Malzemeyi toz haline getirmek için agateden yapılmış olan havan kullanıldı. Numunelerin iç yapılarında bulunan fazların belirlenebilmesi için XRD metodu kullanılmıştır. XRD, XRD difraktometresi (Rigaku DMAX 2200) kullanılarak $40 \text{ kV} / 40 \text{ mA}$ ’da $\text{Cu-K}\alpha$ radyasyonu ile numuneye uygulandı. 2θ değerleri 20° ve 60° olacak şekilde dakikada 1 derece hızla her numune tarandı. XRD açısı pozisyonları, üretilen malzemelerin hegzagonal birim kafes parametrelerini iterasyon metoduyla ölçmek için kullanılmıştır [75].

Hegzagonal kristal sistemlerinde “a” kafes parametresi Bragg denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Aşağıdaki formül kullanılarak “a” hesap edilmiştir [75]:

$$a_0 = \left(\frac{\lambda}{2 \sin \theta}\right) \sqrt{\left(\frac{4}{3}(h^2 + hk + k^2) + \left(\frac{a}{c}\right)^2 l^2\right)} \quad (3.2)$$

a₀: hesaplanacak kafes parametresi,

λ: x-ışını dalga boyu,

θ: (hkl)'e denk gelen Bragg açısı,

a/c: iterasyon metodunda en son hesaplanan oran.

Ayrıca “c₀” kafes parametresini hesaplayabilmek için ise aşağıdaki formül kullanılmıştır [75]:

$$c_0 = \left(\frac{\lambda}{2 \sin \theta}\right) \sqrt{\left(\frac{4}{3}\left(\frac{c}{a}\right)^2(h^2 + hk + k^2) + l^2\right)} \quad (3.3)$$

Hegzagonal yapıya sahip malzemelerin her birim hücresinin hacmi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$V = 2.589(a^2)c \quad (3.4)$$

900°C, 1100°C ve 1300°C'lerde sinterlenmiş malzemelerin X-ışını difraksiyon çizgileri kullanılarak tane boyutları hesaplanmıştır. Bu hesaplamalarda (002) ve (300) düzlemlerindeki yansımalar esas alınmıştır. Tane boyutu (D) değerleri aşağıda gösterilen Sherrer denklemi kullanılarak hesaplanmıştır [75]:

$$D = \frac{K \lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta} \quad (3.5)$$

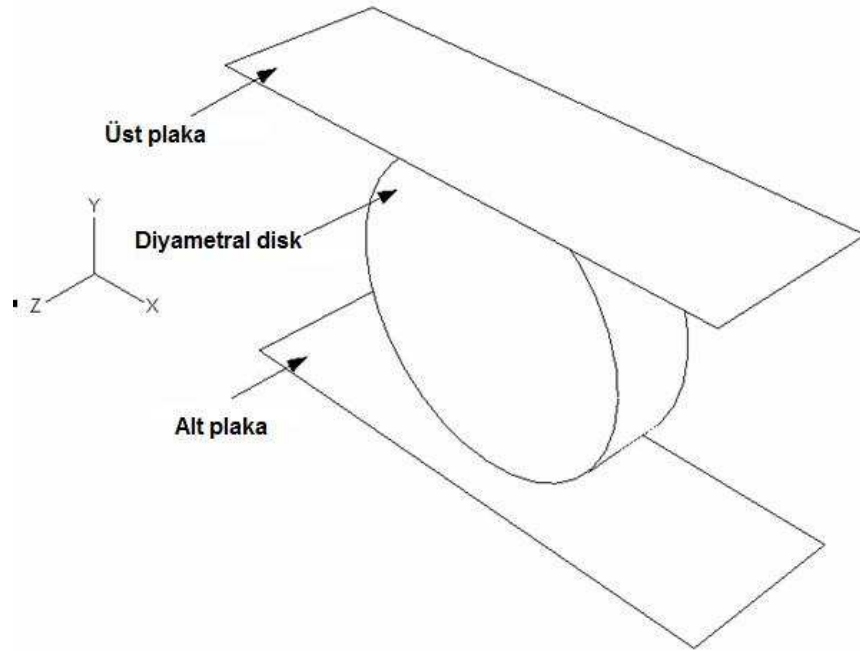
Bu denklemdeki “β_{1/2}” herhangi bir x-ışını şiddeti değerinin yarısındaki genişlik değerini (radyan cinsinden), “K” tane özelliği ile değişen bir sabiti, “λ” x-ışını dalga boyunu, “θ” difraksiyon açısını ifade eder. “K” sabiti 0,9 ve “λ” değeri de 1,514 Å olarak kabul edilmiştir.

3.2.3. Diyametral Mukavemet Testi ile Malzemelerin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Diyametral mukavemet testi, seramiklerin çekme mukavemetlerini ölçmek için kullanılmaktadır. İlk olarak betonun çekme mukavemetini ölçmek için kullanılmıştır. Bu test, diş protez malzemelerinin ve özellikle de dişçilikte kullanılan çimentoların test edilmelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [76-78].

Seramiklerin mukavemetini ölçmek için genellikle eğme testi (bending test) tercih edilmektedir. Fakat bu testi yapabilmek için çok sayıda uzun, kare veya yuvarlak kesitli test numunesi gerekmektedir; bu tür numunelerin hazırlanması da zordur. Diyametral testte ise

silindir şeklindeki bir disk yeterli olmaktadır. Bu diskler Şekil 3.3'teki gibi dik konumda tutulup disklere çapları boyunca dikey yönde basma yükü uygulanır. Ayrıca dik konumdaki diskin altına ve üstüne teste başlamadan önce sürtünmeyi azaltmak amacıyla birer adet metal plaka yerleştirilir. Bu testte, silindirik disk üzerinde dikey yönde basma mukavemeti uygulanırken yükün uygulandığı yöne paralel yönde çekme mukavemeti oluşmaktadır. Uygulanan yüke dik yönde oluşan gerilme maksimum miktardadır. Diyametral test dişçilikte kullanılan biyomedikal malzemelerin mekanik özelliklerini araştırmak için önemli bir testtir. Çünkü dişler üzerinde oluşan gerilmeler ile bu test sonucunda oluşan gerilmeler birbirlerine benzerlikler göstermektedir [79-81].



Şekil 3.3. Diyametral mukavemet testi.

600°C'de kalsine edilmiş toz halindeki saf HA ile Y^{3+} ve F eklenmiş HA'lar uniaxial soğuk basma presi (Carver Inc.) kullanılarak 120 MPa basınç altında 60 saniye tutulup pelet haline getirilmişlerdir. Daha sonra bu peletler 900, 1100 ve 1300°C sıcaklıklarda sinterlenerek ortalama 10,5 mm çapında 2,7 mm kalınlığında silindirik diskler elde edilmiştir. Llyod Universal test cihazı kullanılarak Şekil 3.3'te gösterildiği gibi sinterlenen silindirik numunelere diyametral testler uygulanmıştır. 2.5 kN'luk yük hücresi kullanılarak 2 mm/dak. 'lık hızla uygulanan test sonucunda malzemelerin diyametral mukavemetlerini (S) belirlemek için aşağıdaki formül kullanılmıştır [82,83]:

$$S = \frac{2F}{(\pi \cdot D \cdot t)} \quad (3.6)$$

F: kırılma kuvveti; D: disk çapı; t: disk kalınlığı olarak gösterilmektedir.

3.2.4. FTIR ve RAMAN Spektroskopisi

Saf ve iyon eklenmiş HA'ların içyapılarında bulunan OH⁻ ve F⁻ bağlarını incelemek üzere FTIR ve Raman spektralleri kullanılmıştır. Malzemeler havanda dövüldükten sonra elde edilen tozlar potasyum bromit (KBr) ile 1'e 300 oranında karıştırılıp, soğuk preslenerek saydam peletler elde edilmiştir. Spektrum aralığı 4000 cm⁻¹–400 cm⁻¹ olan 512 spektra/sn taramalı FTIR spektrometresi (Brukers IFS 66/S; Bruker Optics) kullanılmıştır.

Raman spektroskopisi (Brukers FRA 106/S; Bruker Optics) incelemelerinde ise spektrum aralığı 1500 cm⁻¹–100 cm⁻¹ olan 100 spektra/sn tarama hızındaki FT-Raman spektrumları alınmıştır.

3.2.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi

Malzemelerin tane boyutlarının görüntülerini alabilmek için 20 kV voltajdaki JEOL JSM-6400 (JEOL Ltd.) taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. İncelemelerden önce numuneler değişik yüzey pürüzlülüklerine sahip SiC zımpara kağıtları (240-1200 gritli, Buehler Ltd.) ile zımparalandıktan sonra elmas solüsyonu (1 µm) (Buehler Ltd.) ile parlatılmıştır. 0.5 M HF asit ile 2 dakika dağlama (etching) işlemi yapıldıktan sonra son işlem olarak vakum altında altın film ile kaplanmıştır.

SEM'den elde edilen görüntüler ile malzemelerin tane boyutları tespit edilmiştir. Tane boyutlarının hesaplanmasında kesişme metodu (intercept method) kullanılmıştır. Bu metotta 20 cm çevresi olan bir çember kullanılmıştır. Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır [64]:

$$G_{ort} = \frac{L}{N * M} \quad (3.7)$$

G_{ort}: ortalama tane boyutu;

L: çemberin çevresi (20 cm);

N: çember boyunca rastlanılan tane sınırlarının sayısı;

M: magnifikasyon.

3.2.6. Vickers Mikro-Sertlik

Malzemelerin mikro-sertlikleri Vickers mikro-sertlik test cihazı (HMV-2, Shimadzu) ile belirlenmiştir. Sinterlenen disklerin mikro-sertlikleri ölçülmeden önce yüzey pürüzlülüklerini minimize edebilmek için 3.2.5. nolu bölümdeki parlatma prosedürüne uygun olarak parlatılmıştır. Elmas uçlu bir iğne (indentor) ile disklerin üzerine 20 saniye boyunca 200 g yük basılmıştır. Baskı işleminden sonra oluşan şeklin köşegen uzunluğu ölçülerek hesaplamalar yapılmıştır. her bir numuneden 20 ölçüm alınmıştır. Malzemelerin mikrosertliğini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$HV = 0.001854 \frac{P}{d^2} \quad (3.8)$$

HV: Vickers sertliği (GPa);

P (N): uygulanan yük (gm)*9.806/1000;

d (mm): köşegen uzunluğu (µm)/1000.

3.2.7. Kırılma Tokluğu

Mikro-sertlik testi sonucunda oluşan hasarın köşegenlerinden oluşan çentiklerden dolayı meydana gelen çatlakların uzunluklarına göre malzemelerin kırılma tokluğu belirlenmiştir. Kırılma tokluklarının hesaplanması için iki denklem kullanılmaktadır. Çentiklerin oluşturduğu çatlakların şekillerine bağlı olarak hangi denklemin kullanılacağı belirlenmektedir.

Çatlakların şekilleri Şekil 3.4’de gösterilmiştir. ”c/a” oranı 3’ten küçük ise Halfpenny şekli oluşmaktadır. Ama c/a oranı 3’ten büyük olursa Palmqvist şekli çatlaklar gözlemlenmektedir. Halfpenny şekilli çatlaklar oluştuğunda Evans ve Charles denklemi kullanılmıştır [84]:

$$K_{1c} = 0.0824 \frac{P}{C^{1.5}} \quad (3.9)$$

P: uygulanan yük (N);

C: çatlak uzunluğu (m).

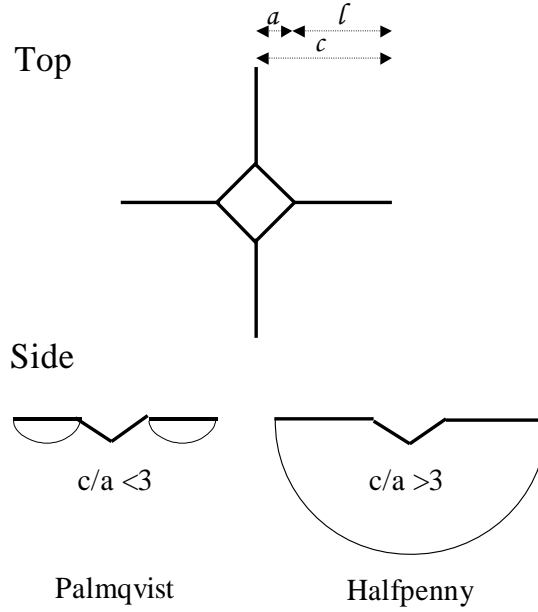
c/a oranı 3’ten küçük olunca Palmqvist şekilli çatlaklar görülür. Bu durumda Palmqvist denklemi kullanılmıştır [85]:

$$K_{1c} = 0.035 \left(\frac{H^{0.6} E^{0.4}}{\phi^{0.6}} \right) \left(\frac{a}{(c-a)^{0.5}} \right) \quad (3.10)$$

H: Sertlik;

E: Elastik modülü;

ϕ : Malzeme sabiti ($\phi \cong 3$).



Şekil 3.4. Vickers mikro-sertlik testinde oluşan Palmqvist ve Halfpenny şekilli çatlakların üstten ve yandan görünüşleri.

3.2.8. Y^{3+} ve F^- Eklenmiş nano-HA Biyoseramiklerinin in Vitro Biyouyumluluklarının İncelenmesi

Biyo-uyumluluğu test edilecek olan hidroksiapatit numuneleri çöktürme yöntemi ile saf hidroksiapatit ve Y^{3+} ve F^- iyonlarıyla zenginleştirilmiş hidroksiapatitler Bölüm 3.1.1’de anlatıldığı şekilde üretilmiştir. Y^{3+} ve F^- iyonlarıyla zenginleştirilen numunelerde F^- miktarı % 2.5 olarak sabit olup, Y^{3+} miktarı % 2.5, % 5 ve % 7.5 olarak değiştirilmek üzere üç değişik kompozisyonda zenginleştirilmiş numune üretilmiştir. Saf ve zenginleştirilmiş hidroksiapatit numuneleri soğuk preste disk haline getirildikten sonra, her kompozisyondan 10’ar adet disk; 900°C, 1100°C ve 1300°C’lerde bir saat sinterlenmiştir. Hazırlanan diskler 1 saat süreyle 200°C sıcaklıkta 2 saat tutularak sterilize edilmiştir.

Biyouyumluluk testleri ISO 10993-5 uygun olarak in vitro sitotoksiste deneyleri ile yapılmıştır. Hücre kültür deneylerinde kemik yönüne farklılaşabilen Saos-2 hücre hattı (insan osteosarkoma kaynaklı) kullanılmıştır. Saos 2 hücreleri hücreleri, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %0.3 antibiyotik içeren DMEM yüksek glikoz hücre vasatı içinde karbondioksit

etüvünde kültive edilmiştir. Hücre vasatı üç günde bir yenilenmiştir. Saos 2 hücreleri %0.1'lik tripsin-EDTA ile 1:3 oranında pasajlanmıştır.

3.2.8.1. Disklerden Elde Edilen Ekstraktlerde İn Vitro Sitoksisite Çalışmaları

% 0.3 antibiyotik, 10^{-8} M deksametazon, 82 µg/ml askorbik asit ve 10 mM β-gliserolfosfat içeren DMEM vasatı disklerden çözünür malzemelerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Sterilize edilen diskler sinterlendiği sıcaklıklar ve kompozisyonlarına göre gruplandırıldıktan sonra, 0.2 gram disk üzerine 1 ml vasat gelecek şekilde vasatların içine yerleştirilmiştir. Diskler vasatların içinde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda vasatlar disklerin üzerinden alınmış, içlerine % 10 oranında FBS eklenerek serumlu ekstrakt vasatları elde edilmiştir.

20 000 hücre/ cm² olacak şekilde hücreler 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Histolojik boyamaları için ayrıca hücreler 12 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Ekilen hücreler 24 saat süreyle hücre vasatı içerisinde 37°C'de karbondioksit etüvünde kültive edildikten sonra, hücre vasatları boşaltılıp yerine saf HA, 2.5YFHA, 5YFHA, 7.5YFHA diskleriyle hazırlanan ekstrakt vasatları konmuştur. Pozitif kontrol grubu olarak DMEM büyüme vasatında kültive edilen hücreler kullanılmıştır. Ekstraktlar içinde 2 gün süreyle kültive edilen hücrelerinin mikroskopik incelemeleri, MTT canlılık testleri ve histolojik boyamalar ile değerlendirilmiştir.

3.2.8.1.1. MTT Canlılık Testleri

Hücre canlılık testi için ekstratlar 48 saatlik inkübasyon sonunda ortamdan uzaklaştırılmış ve DMEM düşük glikoz vasat içerisine eklenen MTT (5 mg/ml) ile eklenmiştir. Hücreler 4 saat boyunca 37°C' de % 5'lik karbondioksit ortamında karanlıkta bekletilmiştir. 4 saat sonunda MTT ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Son olarak, DMSO eklenerek 10 dakika orbital çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Kuyucukların 550 nm dalga boyundaki ışık tutulum değerleri mikropilaka okuyuculu spektrofotometre (BioTek, USA) ile ölçülmüştür.

3.2.8.1.2. Histolojik Boyamalar

Hücrelerdeki kollajen dağılımının gözlenmesi için hücreler % 4'lük gluteraldehid çözeltisinin içinde 30 dakika süreyle bekletildikten sonra PBS ile yıkanarak sabitlenmiş, daha sonra pikrik asit içinde hazırlanmış % 0.1'lik Direct Red ile boyanmıştır. Hücreler boyanın

içinde 1 saat bekletildikten sonra asitlenmiş su (750 µl asetik asit/ 150 ml distile su) ile yıkanmış ve histolojik değerlendirme için mikroskopik olarak incelenmiş ve görüntülenmiştir.

Hücreler tarafından ortama salgılanan kalsiyum varlığının değerlendirilmesi için hücreler %70'lik etil alkolle 30 saniye sabitlendikten sonra Alizarin kırmızısı ile boyanmıştır. Hücreler boyanın içinde 10 dakika bekletildikten sonra tekrar distile su ile yıkanmış ve mikroskopik olarak incelenmiş ve görüntülenmiştir.

3.2.8.2. Hücre Yapışması ve Çoğalması

Elde edilen malzemelerden çıkanların toksisitesinin incelenmesinin yanında biyouyumluluk çalışmaları için ayrıca “biyomalzeme ile kontakt halinde” gerçekleştirilen analizler de yapılmıştır. Bu amaçla HA ve iyonlarla zenginleştirilmiş HA diskleri soğuk pres ile hazırlanmıştır. Diskler 200°C'de iki saat bekletilerek sterilize edilmiştir. DMEM içindeki Saos-2 hücreleri disk başına 5×10^4 hücre gelecek şekilde üzerlerine ekilmiştir. Hücreli disklerin üzerine eklenen büyüme vasatı eklenmiştir (% 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 0.1 sodyum pürivat içeren DMEM vasatı) . Saos-2 hücreleri diskler üzerinde 1, 3 ve 5 gün boyunca 37°C'deki karbondioksit inkübatörü içinde kulture edilmiştir. Hücre kültür vasatı 3 günde bir değiştirilmiştir. Diskler üzerindeki hücre yapışması ve çoğalması MTT canlılık metodu ile incelenmiştir. Belirtilen günlerin sonunda büyüme vasatları çekilip diskler üzerine MTT (5 mg/ml) eklenmiş ve karbondioksit inkübatöründe 37°C'de 4 saat bekletilmiştir. MTT yaşayan hücrelerin dehidrogenaz enzimleri tarafından çözünmeyen mor formazan kristallerine indirgenmektedir. 4 saatlik inkübasyon sonunda MTT solüsyonu çekilip diskler PBS ile yıkanmıştır. Yıkanan diskler üzerine DMSO konulmuş formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Oluşan bu solüsyon içinden diskler alınmış ve spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. 550 nm'de μ OuantTM mikroparka spektrofotometre (Biotek Instruments Inc, USA) ile okunan abzorbans değerleri hücre yapışma verimliliği ve çoğalması hesaplanmıştır. Saos-2 hücrelerinin yapışma verimi hücre kültür polisitiren plakalara (TCPS) göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Yapışma Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Abzorbans (550 nm)}_{\text{disk 24saat}}}{\text{Abzorbans (550 nm)}_{\text{TCPS 24saat}}}$$

Hücre morfolojileri 1 ve 5 günlük inkübasyonlardan sonra taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM analizlerinden önce diskler üzerindeki hücreler PBS içinde % 2.5'lük glutaraldehid içerisinde 1 saat bekletilerek fiksasyon yapılmıştır. Fiksasyon sonunda

distile su ile yıkanan diskler 70, 80, 90 ve 100'lük etanol serilerinden geçirilip kurutulmuştur. Diskler altın ile kaplandıktan sonra tamalaı elektron mikroskopisi ile incelenmiştir.

3.2.8.3. ALP Analizleri

ALP aktivitesi osteoblastik hücre yönünde farklılaşmanın incelenmesinde kullanılan önemli bir osteojenik farklılaşma göstergesidir. Hidroksiapatit numuneleri çöktürme yöntemi ile saf hidroksiapatit ve Y^{+3} ve F^- iyonlarıyla zenginleştirilmiş hidroksiapatit olarak üretilmiştir. Y^{+3} ve F^- iyonlarıyla zenginleştirilen numunelerde F^- miktarı %2.5 olarak sabit olup, Y^{+3} miktarı %2.5, %5 ve %7.5 olarak değiştirilmek üzere üç değişik kompozisyonda zenginleştirilmiş numune üretilmiştir. Saf ve zenginleştirilmiş hidroksiapatit numuneleri soğuk preste disk haline getirilmiştir. Hazırlanan diskler 1 saat süreyle 200°C sıcaklıkta 2 saat tutularak sterilize edilmiştir.

Saos-2 hücreleri disklerin üzerine (4×10^4 /disk) olarak ekilmiştir. Diskler osteojenik farklılaşma vasatının içerisinde 37°C'deki karbondioksit inkübatöründe 14 gün boyunca inkübe edilmişlerdir. Vasat 3 günde bir tazelenmiştir.

ALP aktivite metodunda protokol kısaca şöyledir: 7 ve 14 günlük inkübasyonlar sonunda diskler üzerindeki hücelere % 0.1 Triton X-100 ve 0.1 % sodium azid 600 µl'lik solüsyonlar eklenerek hücrelerin patlatılması sağlanmıştır. 3 defa dondur-çöz döngüsü sonunda hücre lizatları (lysate) hazırlanmıştır. Her bir lizattan 20 µl alınıp üzerine 100 µl pNPP substrat solüsyonu eklenmiştir. 15 dakika 37°C'deki inkübasyondan sonra her bir örneğin 405 nm'deki aborbansı µOuantTM microplaka spektrofotometresinde ölçülmüştür. İnkübasyon sonuncunda oluşan p-nitrophenol 25-250 µM'de çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. ALP aktivitesi hücre lizatlarının protein miktarı ile normalize edilmiştir. Spesifik ALP aktivitesi nmol/mg protein/min şeklinde ifade edilmiştir.

Hücrelerin ürettiği protein miktarı Bicinchoninic Acid (BCA) metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Bu metot bakır Cu^{2+} iyonunun protein tarafından Cu^{1+} iyonuna indirgenmesi temeline dayanmaktadır. BCA metodunda kullanılan örnekler ALP metodunda kullanılan hücre lizatları ile aynıdır. Bu metotta kullanılan substrat 1 ml bakır sülfat ve 50 ml BCA reaktiflerinden oluşmaktadır. 50 µl hücre lizatının üzerine bu solüsyondan 1 ml eklenir ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 562 nm'de önceki metotlarda kullanılan spektrofotometre ile aborbansları ölçülür. Her bir lizattaki protein miktarı 0-1.2 mg/ml aralığında bovine serum albümin kullanılarak elde edilen standart eğrisi ile belirlenir.

3.2.8.4. Kalsiyum Birikimi Analizi

HA ve iyon eklenmiş HA diskler üzerine ekilmiş hücrelerin kemik yönünde farklılaşmaların incelenmesi için hücreler tarafından diskler üzerinden depolanan kalsiyum miktarları kolorimetrik ve FTIR yöntemleri ile incelenmiştir.

7 ve 14 günlük inkübasyon sonrasında ekilen hücreler tarafından üretilen kalsiyum içeriğinin belirlenmesi için, ALP protokolünde kullanılan hücrelerin lizatları kullanılmıştır. Diskler üzerinde biriken kalsiyum miktarının tayini için kalsiyum o-crezolphthalein kompleks yöntemi kullanılmıştır. Hücre lizatlarından 100 µl örnekler alınarak, 1 ml renk ayracı ve 1 ml tampon çözeltisine eklenmiştir. Renk ayracı, 25 mg o-crezolphthalein komplekson tozunun (Sigma, ABD) 250 ml distile edilmiş su ve 15 ml derişik HCl ile karıştırılması ile hazırlanmıştır. Tampon çözeltisi, 37.8 ml adenozin monofosfat (AMP) ayracı ve 250 ml distile su kullanılarak, 10.7'lik pH' da oluşturulmuştur. Ayrıçaları, örnekler ile karıştırdıktan sonra, oluşturulan karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 540 nm'deki emilim değerleri, µQuantTM mikrolevha spektrofotometre ile belirlenmiştir. Oluşan kalsiyum miktarı tayini için, 0-12.5 mg/dl aralığında oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Biriken kalsiyum içeriği, hücre lizatlarının protein içeriği ile normalize edilmiştir. Kalsiyum içeriği Ca/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.

FTIR yöntemi ile diskler üzerinde mineralizasyon analizleri için% 100 konfluense ulaşan hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra % 0,1'lik tripsin EDTA ile flask tabanından kaldırılmıştır. Daha sonra hücreler 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek hücre vasatından ayrılmıştır. 5×10^4 hücre 900, 1100 ve 1300°C sıcaklıklarda sinterlenmiş diskler üzerine ekilmiş ve 21 gün kemik farklılaşma vasatında (% 10 FBS, % 0.3 antibiyotik, 10^{-8} M deksametazon, 82 µg/ml askorbik asit ve 10 mM β-gliserolfosfat içeren DMEM) kültive edilmiştir. Hücre vasatları üç günde bir yenilenmiştir. 21 günlük inkübasyon sonunda vasatları boşaltılıp PBS ile yıkanan diskler üzerindeki hücreler, 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi (pH 8.0) ile liyofilize edilmiştir. Elde edilen çözelti oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış, kurutma işlemi sonucunda elde edilen tozların mineral ve protein içerikleri FTIR-ATR spektroskopisi ile incelenmiştir. Mineral içeriği 900-1200 cm^{-1} aralığında görülen fosfat absorbands alanının, 1585-1720 cm^{-1} aralığında görülen protein amide I absorbands alanına oranının hesaplanması ile bulunmuştur.

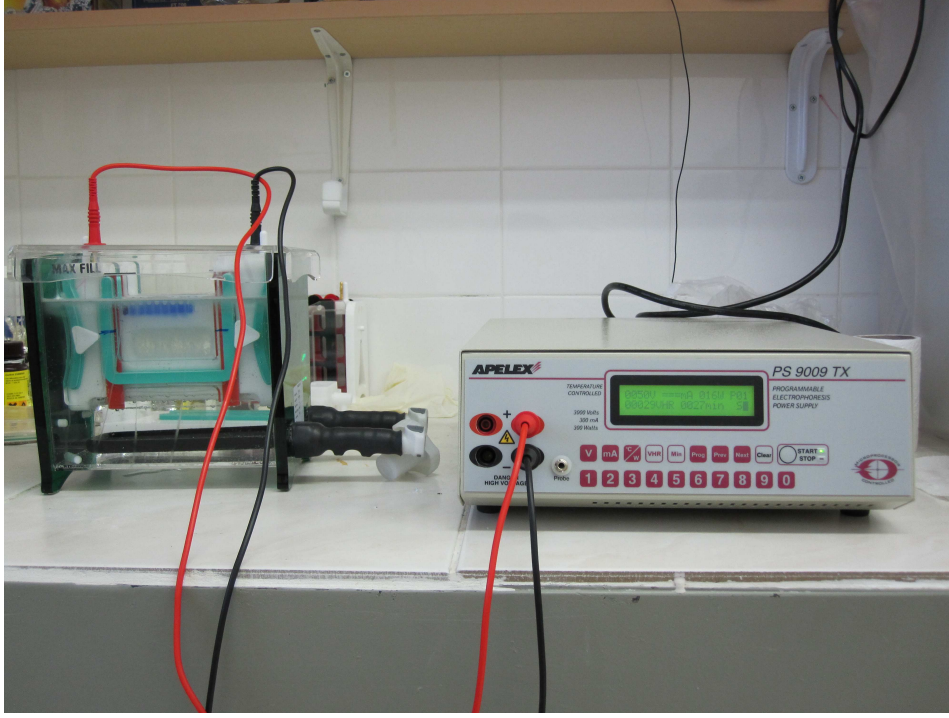
3.2.8.5. Kolajen Tip I ve Osteokalsein Birikimi Analizleri

% 100 konfluense ulaşan hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra % 0.1'lik tripsin EDTA ile flask tabanından kaldırılmıştır. Daha sonra hücreler 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek hücre vasatından ayrılmıştır. Yapılan sayımlarda 5 ml hücre vasatında 10–12 milyon hücre bulunduğu belirlenmiştir. Hücreler kuyucuklarında birer adet hidroksiapatit diski bulunan 6 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 10^6 hücre düşecek şekilde ekilmiştir. Hücre vasatı olarak %10 FBS, %0.3 antibiyotik, 10^{-8} M deksametazon, 82 µg/ml askorbik asit ve 10mM β-gliserolfosfat içeren DMEM osteoblastik farklılaşma vasatı kullanılmıştır. Hücreler 14 gün süreyle karbondioksit etüvünde kültive edilmiştir. Hücre vasatları üç günde bir yenilenmiştir. Saf HA, 2.5YFHA, 5YFHA, 7.5YFHA hidroksiapatit diskleri 900, 1100 ve 1300°C sıcaklıklarda sinterlenmiştir.

3.2.8.5.1. Western Blotting

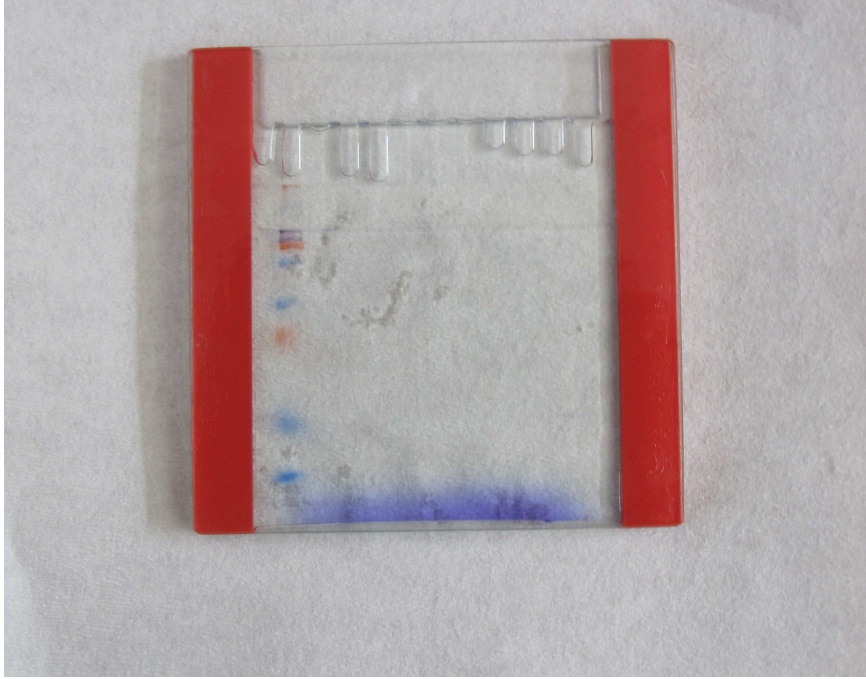
14 günlük inkübasyon sonunda hücreler 150 mM sodyum klorür, %1.0'lik Triton X-100 ve 50 mM Tris pH 8.0, içeren liziz çözeltisi ile tahrip edilmiş ve elde edilen hücre lizatları %6 SDS, %30 gliserol, %15 2-merkaptöetanol ve %0.01 bromofenol mavisi içeren 1 M Tris HCl (pH 6.8), çözeltisiyle 95°C'de 7 dakika kaynatılarak denatüre edilmiştir.

Elektroforez camları arasına önce seperatör jel, ardından istifletiyici jel dökülmüştür. %8'lik seperatör jel hazırlanmasında %40 PAA karışımı, 4X seperatör jel karışımı (pH 8.8, 1 M Tris-Cl, %0.1 SDS dH₂O), %10 APS ve TEMED kullanılmıştır. Seperatör jel donduktan sonra, %40 PAA karışımı, 4X istifleyici jel karışımı (pH:6.8, 0.5M Tris-Cl, %0.1 SDS dH₂O), %10 APS ve TEMED içeren %4'lük istifleyici jel camların arasına eklendikten sonra jelin üzeri tarakla kapatılmıştır. Camların arasında donan jel içinden voltaj geçen casting ünitesinin içine konmuş ve düzenek banyonun içine yerleştirilmiştir. Banyonun içerisine tris, glycine ve SDS'den oluşan elektroforez tampon çözeltisi doldurulmuştur. Jelin üzerine kapatılan tarak çıkarılarak tarak tarafından jelde oluşturulan kuyucuklara ince pipet ucuyla 40-50 µl kadar denature edilmiş hücre lizatı ve protein sabitleri yüklenmiştir. Banyonun kapağı kapatılarak ve 100 volt elektrik ile 1,5 saat kadar süreyle yürütme işlemi yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Jel elektroforez düzeneği.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel camlarının arasından çıkarılmış ve metanol, elektroforez tampon çözeltisi ile sudan oluşan transfer tampon sıvısının içinde 10 dakika sallanarak yıkanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Jelde yürütülen örnekler ve protein sabiti.

PVDF membranları 30 saniye metanolde bekletildikten sonra su ile 5 dakika, daha sonra transfer tampon sıvısında 10 dakika yıkanarak muamele edilmiştir.

Transfer işlemi için jel ve membran transfer kasetinin içinde biraraya getirilmiştir. Tankın içine yerleştirilirken jelin (-), membranın (+) tarafa gelmesi gerekmektedir. Buna göre kasetin (-) yöne gelecek tarafına sünger, üzerine filtre kağıdı (whatman no:1) ve üzerine jel konmuştur. Jel transfer tamponu ile ıslatıldıktan sonra, membran jelin üstüne arada hava kalmayacak şekilde 45°'lik bir açıyla kapatılmıştır. Üzerine tekrar filtre kağıdı ve sünger konduktan sonra kaset kapatılmış ve tankın içine yerleştirilmiştir. Banyonun içi kasetin üzerini kapatacak kadar transfer tamponu ile doldurulmuştur. Banyo karıştırıcı üzerine konularak, 4°C sıcaklıkta 100 volt elektrik verilerek 1 saat 45 dakika sürele transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

Transfer işlemi sonunda membran NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄.12H₂O ve %0.1 Tween-20 içeren PBS-T yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra %5 süt tozu içeren PBS-T (bloklama çözeltisi) ile 4°C'de bir gece bloklama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.7). Bloklama işleminin ardından membran PBS-T ile 10 dakika yıkanmış ve antikor muamelesinden geçmiştir.



Şekil 3.7. Membrana bloklama işleminin uygulanması.

Membran öncelikle 1:1000 oranında bloklama çözeltisi içinde seyreltilen birincil antikor (Anti-Collagen Tip I) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu işlemin

sonunda PBS-T ile 30 dakika, 3 kez PBS-T yenilenerek yıkanmıştır. Ardından membran 1:2000 oranında bloklama çözeltisi içinde seyreltilen ikincil antidi (Anti mouse IgG-HRP) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS-T ile 30 dakika, en az 3 kez PBS-T yenilenerek yıkanma işlemi tekrarlanmıştır. Bu işlemlerin ardından membran filtre kâğıtları arasında kurutulduktan sonra ikincil antikor substratı ile 1 dakika kadar karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra membran streç filme sarılarak x-ray kasetinin içine yerleştirilmiş, üzerine x-ray filmi konularak film en az 1 dakika süreyle ekspozite edilmiştir. Film banyo edildikten sonra elde edilen sinyaller protein sabitinin bantlarıyla karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

3.2.8.5.2. İmmunohistokimyasal Analizler

100 000 hücre 12 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Histolojik boyamaları için ayrıca hücreler 12 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Ekilen hücreler 24 saat süreyle farklılaşma vasatı içerisinde 37°C'de karbondioksit etüvünde kültive edildikten sonra HA, 2.5YFHA, 5YFHA, 7.5YFHA diskleri kuyucuklara yerleştirilmiştir. Hücreler disklerle birlikte farklılaşma vasatı içerisinde 14 gün karbon dioksit etüvünde kültive edilmiştir. Hücre kültür vasatı her üç günde bir değiştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler % 2.5'lük glüteraldehid ile 2 saat bekletilerek fiske edilmiştir. Hücrelere daha sonra artan 1 dakika 0.1 M kakodolik asit tamponu ile bekletilmiş ve artan konsantrasyonlu alkol serisinden (5'er dakika %70, %80, %90 ve en son olarak %100 alkol) for 5 minutes each geçirilmiştir. Fiksasyon aşamasından sonra hücreler %0.1 Triton X-100 bekletilmiş ve permeabilize edilmiştir. %0.5 BSA ve %0.1 Tween-20 içeren PBS tamponu ile hücreler yarım saat bekletilerek spesifik olmayan bağlanmaları engellenmiştir. Bloklama işleminden sonra hücreler anti-kollajen Tip 1 monoklonal IgG₁ (1:1780) veya Osteokalsein monoklonal IgG₁ (1:1780) birincil antikorları 4°C'de bir gece boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklar bloklama tamponu ile 2 kere yıkanmıştır. Daha sonra hücreler anti fare IgG-HRP (1:2000) ikincil antikoruyla 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde kuyucuklar PBS ile 2 kere yıkandıktan sonra Pierce® ECL Western Blotlama Substrat Solusyonu ile 1 saat bekletilmiştir. Son aşama olarak kuyucularda 5 farklı bölgenin faz kontrat mikroskopunda fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen fotoğraflarda hücreler 5 pictures Image J yazılım programıyla oluşan mavi bölgeler ölçülmüş ve semikuantitatif analizler yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Malzemelerin Yoğunluklarının Hesaplanması

HA'nın teorik yoğunluğu 3.156 g/cm^3 'tür. Bu araştırmada kullanılmış olan malzemelerin sinterleme sıcaklıklarına göre rölatif yoğunlukları Tablo 4.1'de sunulmuştur. Bu da malzememizin yüksek yoğunluğa sahip olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.1. Malzemelerin sinterleme sıcaklıklarına göre rölatif yoğunlukları.

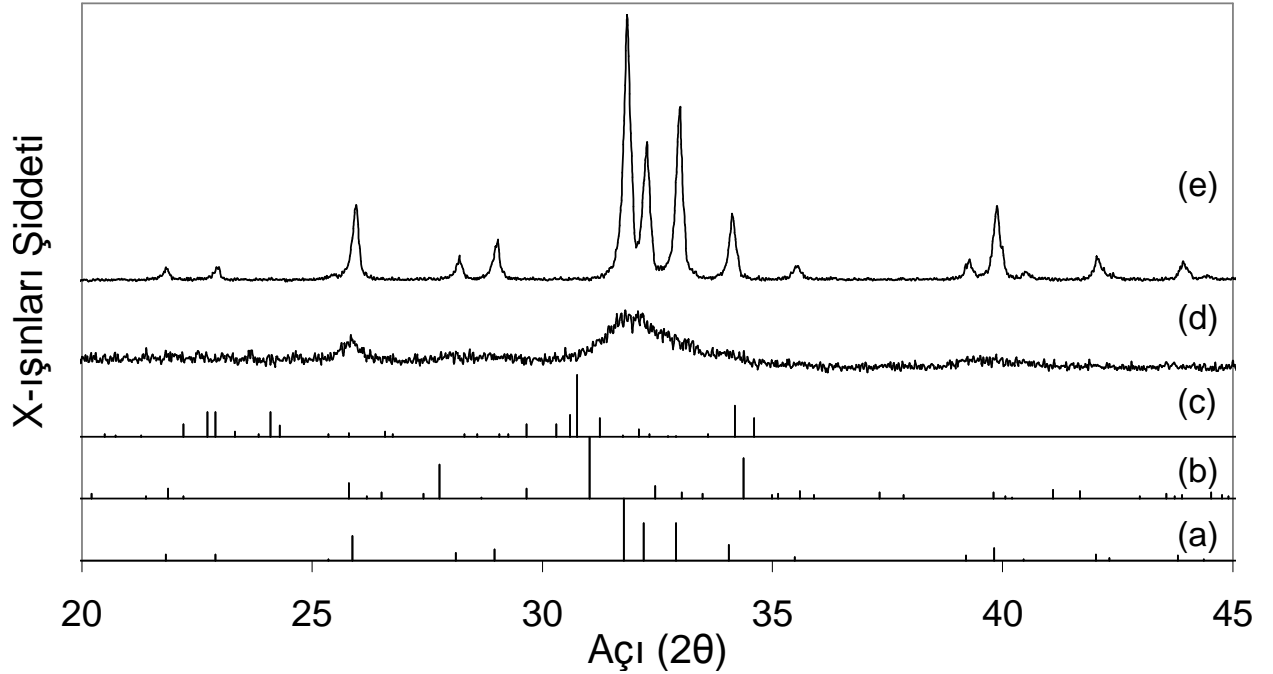
Numune #	900°C	1100°C	1300°C
Saf HA	85,7	94,5	94,3
2.5YFHA	97,2	99,2	98,9
5YFHA	95,7	95,9	96,5
7.5YFHA	92,8	95,3	97,6

Tablo 4.1'de görüldüğü gibi üretilen bütün malzemelerin yoğunlukları her üç sinterleme sıcaklığı için de teorik yoğunluğun en az % 85'inin üzerindedir. Bu da üretilen malzemelerin yüksek yoğunlukta uygun porozite ile elde edildiğini göstermektedir. Farklı sıcaklık ve kompozisyonlardaki malzemelerin ayrı ayrı yoğunluklarını incelediğimiz zaman değerler arasında çok büyük farklılıklar gözlemlenmemiştir.

900°C, 1100°C ve 1300°C'lerde sinterlenen malzemelere baktığımızda en yüksek yoğunluğa sahip malzemenin 2.5YFHA olduğu görülmektedir. Malzemelerin bu sıcaklıklarda sinterlenmeleri sonucunda, en düşük yoğunluğa sahip malzemelerin saf HA'lar olduğu görünmektedir. 2.5YFHA malzemeleri bütün sinterleme sıcaklıklarından sonra en yüksek yoğunluklara sahiptir. 5YFHA ve 7.5YFHA malzemeleri ise saf HA'ya göre daha yüksek, 2.5YFHA'ya göre ise daha düşük yoğunluklara sahiptir. Yoğunluk hesaplamalarından 2.5YFHA malzemesinin en yüksek yoğunluğa sahip olduğu görülmekte olup, Y3+ iyonlarının %2.5'dan daha fazla ilave edilmesi ise yoğunluğun düşmesine neden olmaktadır. Bunun nedenlerine XRD sonuçları tartışılırken değinilecektir.

4.2. Üretilen Malzemelerin X-ışınları Difraksiyonu ile İç Yapı İncelenmeleri

Şekil 4.1'de saf HA'ya ait X-ışınları karakterizasyonu sonuçları sunulmaktadır. Burada görülen bütün X-ışınları tepeleri (Şekil 4.1-d,e) saf hidroksiapatite aittir. X-ışınları karakterizasyonu sonucu Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) kartları ile karşılaştırılmış olup standard hidroksiapatite ait olan (JCPDS # 9-432) nolu kart (Şekil 4.1-a) ile %100 uyumlu olduğu görülmüştür. Şekil 4.1-d'de görüldüğü gibi 100°C'de kurutulmuş HA'da oluşan XRD tepecikleri kısa boylu ve geniştir. Bu ise 100°C'de kurutulmuş HA'nın tane boyutlarının (yani 50 nm'den daha ufak) çok ufak olduğunu göstermektedir. 1100°C'de sinterlenmiş HA'da (Şekil 4.1-e) ise XRD tepecikleri çok yüksek ve dardır.

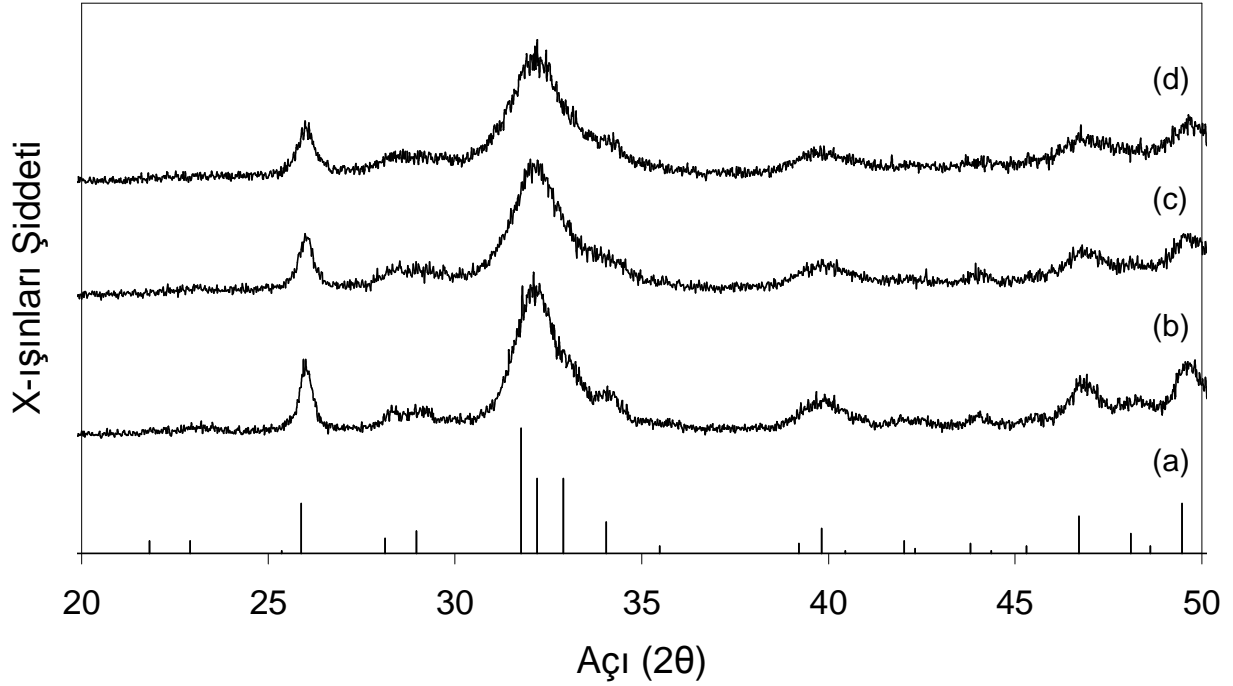


Şekil 4.1. HA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart HA, b) JCPDS#: 09-169 numaralı karta göre standart β-TCP, c) JCPDS#: 09-348 numaralı karta göre standart α-TCP, d) 100°C'de kurutulmuş HA, e) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş HA.

Bu sonuçlara göre HA'nın gayet kristal bir iç yapıda olduğu ve tane boyutlarının ise 200°C'de kurutulmuş HA'ya göre daha büyük olduğunu göstermektedir. 1100°C'de sinterlenmiş HA'da herhangi bir ikincil faza rastlanmamıştır. HA'nın içerisinde ikincil bir faz oluşması durumunda en çok rastlanan faz TCP'dir. Şekil 4.1-b ve 4.1-c'de standart TCP'ye ait X-ışınları tepecik pozisyonları gösterilmiştir. 100°C'de kurutulmuş ve 1100°C'de

sinterlenmiş HA'da bu TCP fazlarına ait herhangi bir X-ışınları tepesiğine rastlanmamıştır. Bu da üretilmiş HA'nın saf HA olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.2'de Y^{3+} ve F^- ilave edilmiş HA'ların X-ışınları metodu ile elde edilmiş olan sonuçları görülmektedir.



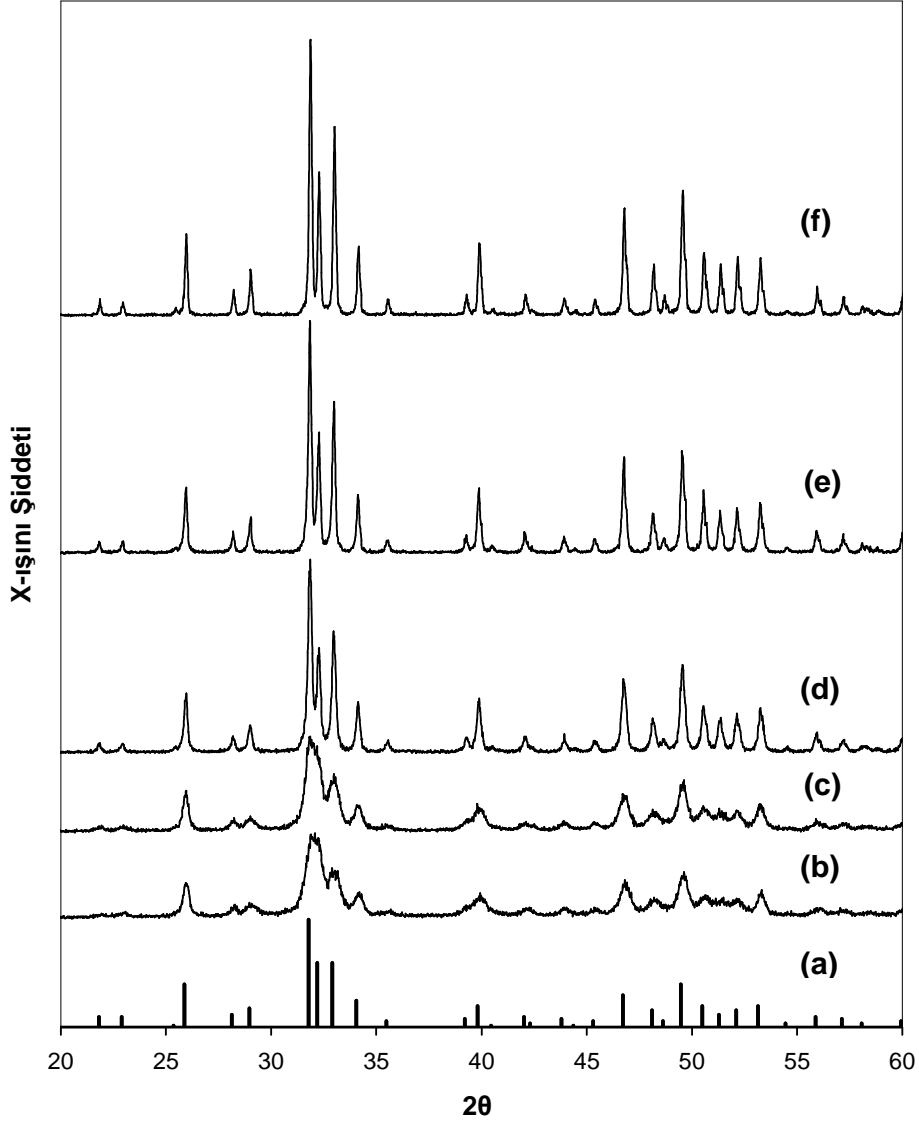
Şekil 4.2. Y^{3+} ve F^- ilave edilmiş HA'ların XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektraller: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart HA, b) 200°C'de kurutulmuş % 2.5 Y^{3+} ve % 2.5 F^- ilave edilmiş HA, c) 200°C'de kurutulmuş % 5 Y^{3+} ve % 2.5 F^- ilave edilmiş HA, d) 200°C'de kurutulmuş % 7.5 Y^{3+} ve % 2.5 F^- ilave edilmiş HA.

X-ışınları sonuçları JCPDS kartları ile karşılaştırılmış olup standard HA'ya ait olan (JCPDS # 9-432) nolu kart (Şekil 4.2-a) ile %100 uyumlu olduğu görülmüştür. Şekil 4.2 (b,c,d)'de görüldüğü gibi 200°C'de kurutulmuş Y^{3+} ve F^- ilave edilmiş HA'larda oluşan XRD tepelikleri kısa boylu ve geniştir. Bu ise bu malzemelerin tane boyutlarının (50 nm'den daha ufak) çok ufak olduğunu göstermektedir.

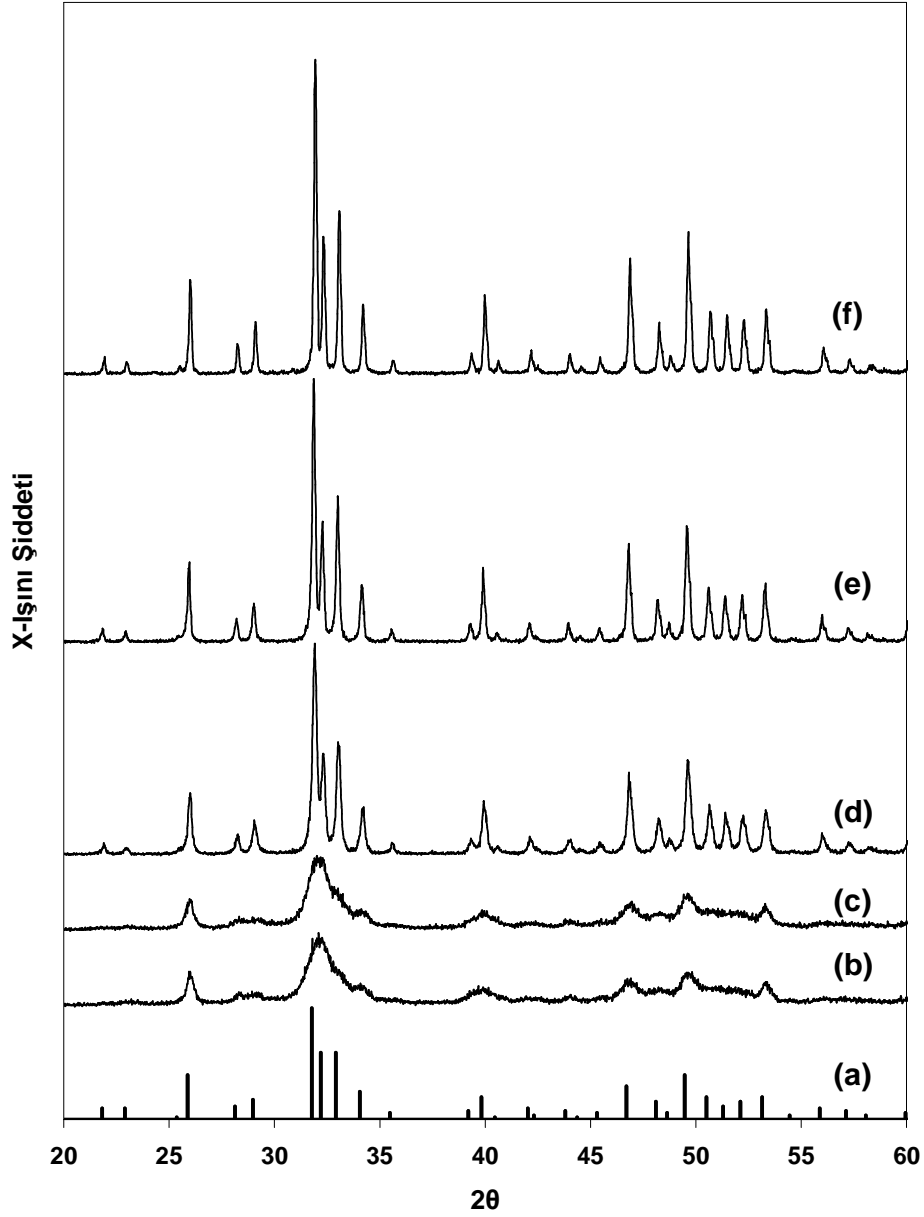
Üretilen HA'nın hekzagonal kafes parametrelerinin standard HA'nın kafes parametrelerine yakın olduğu görülmüştür. Bu da sinterlenmiş olan HA'nın tamamen hekzagonal kristal yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

Şekiller 4.3–4.6'de farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş ve farklı kompozisyonlara sahip saf iyon katılmış HA'ların XRD metodu sonucunda elde edilen eğrileri görülmektedir. Bu

şekilleri incelediğimizde malzemelerin içindeki fazları ve malzemelerin tane boyutlarını belirlemek mümkündür.



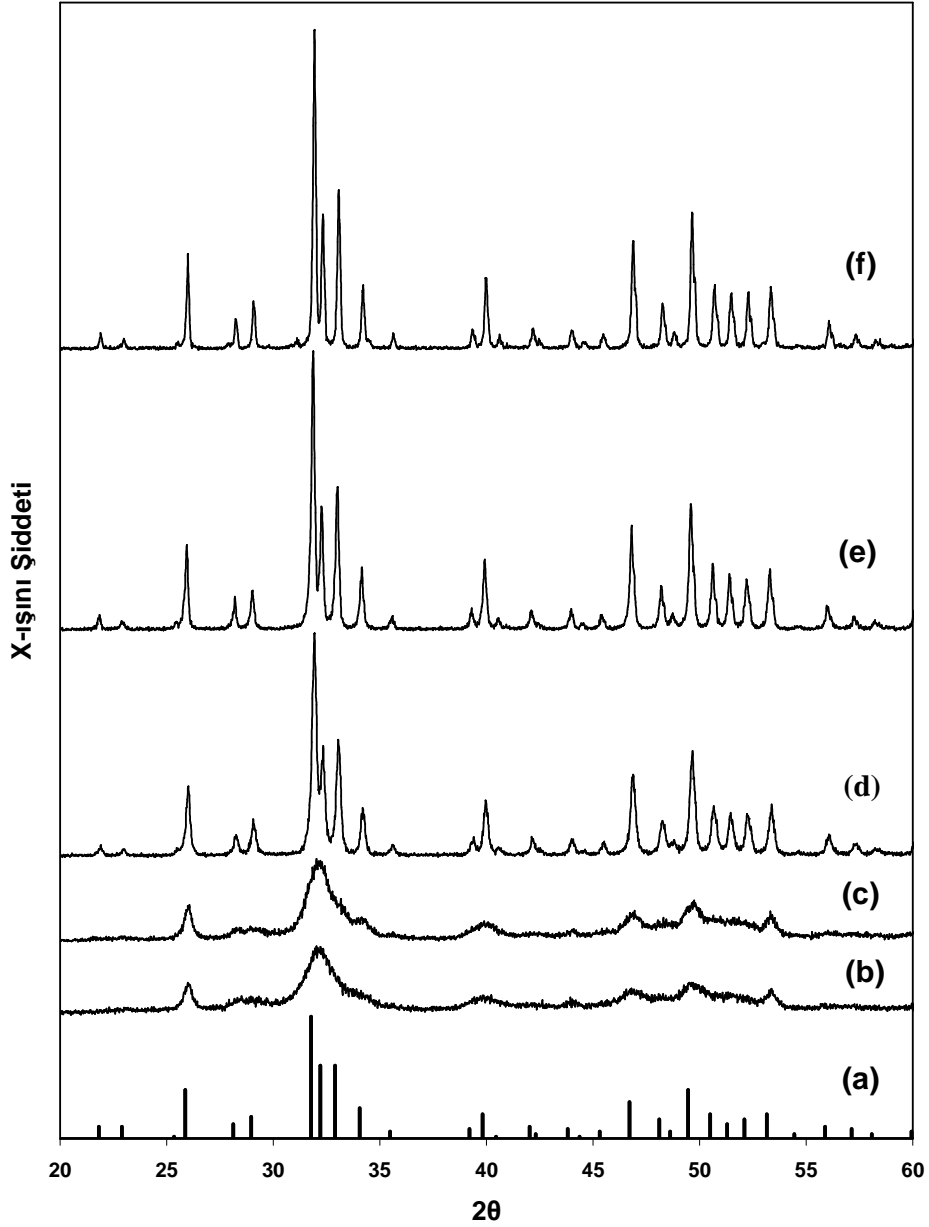
Şekil 4.3. HA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektraller: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart HA, b) 200°C'de kurutulmuş HA, c) 600°C'de 30 dakika kalsine edilmiş HA, d) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, e) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, f) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş HA.



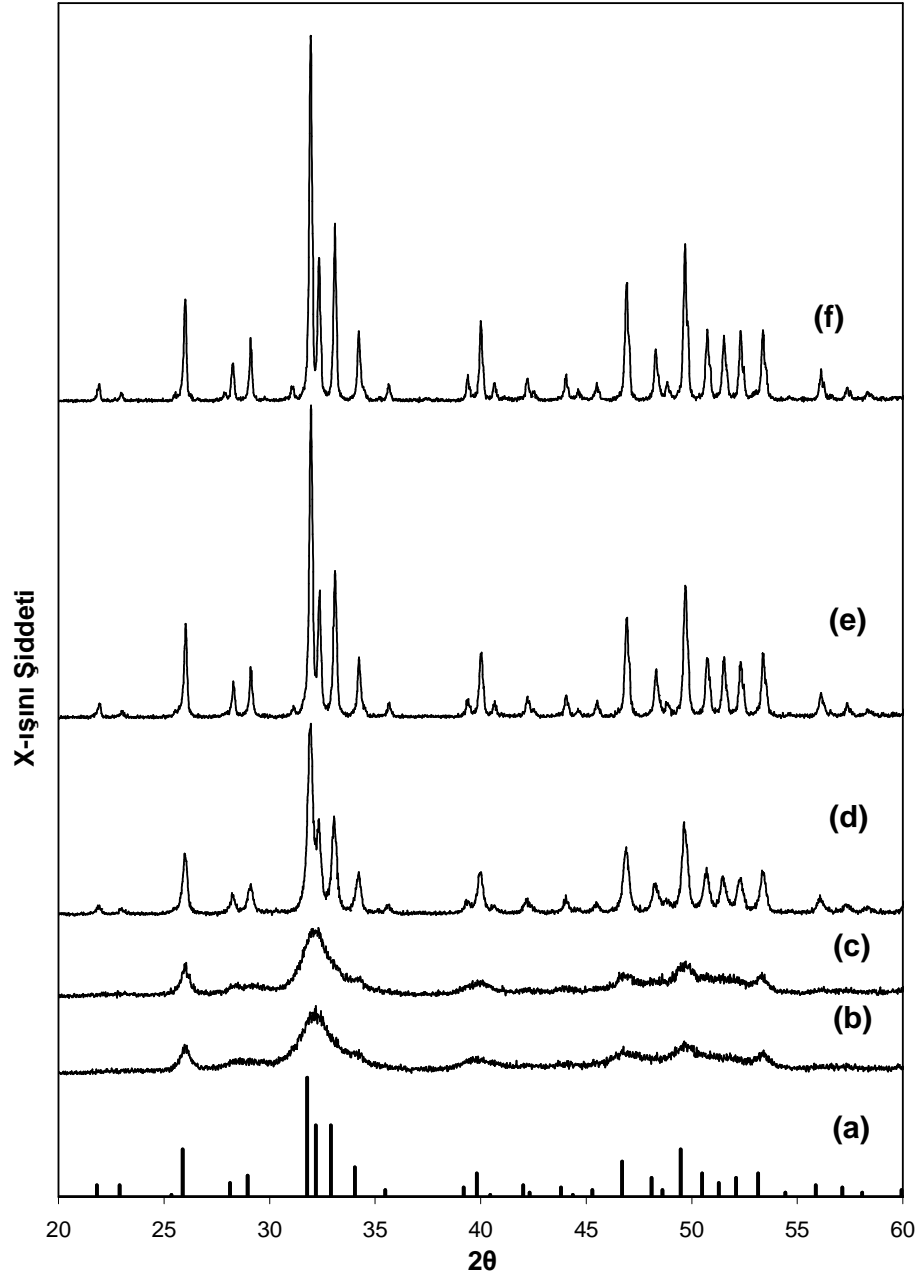
Şekil 4.4. 2.5YFHA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektraller: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart 2.5YFHA, b) 200°C'de kurutulmuş 2.5YFHA, c) 600°C'de 30 dakika kalsine edilmiş 2.5YFHA, d) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, e) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, f) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA.

Öncelikle XRD eğrilerine bakarak malzeme içindeki fazlar incelendiğinde hiçbir sıcaklık ve hiçbir kompozisyon için hidroksiapatit dışında baskın bir faz bulunamamıştır. XRD metodu sonucu elde edilen sonuçlar JCPDS kartları ile karşılaştırıldığında standart

hidroksiapatite ait olan (JCPDS # 9-432) eğrilerin aynı şekilde tüm malzemelerin sonuçlarında da var olduğu gözlemlenmiştir. Hatta bunun dışında fazlardan başka bir faza da rastlanmamıştır.



Şekil 4.5. 5YFHA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart 5YFHA, b) 200°C'de kurutulmuş 5YFHA, c) 600°C'de 30 dakika kalsine edilmiş 5YFHA, d) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, e) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, f) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA.



Şekil 4.6. 7.5YFHA'nın XRD metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) JCPDS#: 09-432 numaralı karta göre standart 7.5YFHA, b) 200°C'de kurutulmuş 7.5YFHA, c) 600°C'de 30 dakika kalsine edilmiş 7.5YFHA, d) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, e) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, f) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA.

Saf HA ve 2.5YFHA malzemesinde bütün sinterleme sıcaklıklarından sonra sadece HA fazı gözlemlenmiştir. Sadece 1100°C'de sinterlenen 7.5YFHA'da ile 1300°C'de sinterlenen 5YFHA ve 7.5YFHA numuneleri için çok küçük yoğunluklarda β -TCP tepelerine rastlanmıştır. 5YFHA'nın 1300°C'de sinterlenmesi sonucu $2\theta=31.12$ değerinde şiddeti çok

düşük bir β -TCP tepesi oluşmuştur. 7.5YFHA'ta ise numune 1100 ve 1300°C'de sinterlendikten sonra sırasıyla $2\theta=31.04$ 'te ve $2\theta=31.14$ 'te yoğunlukları çok ufak β -TCP'lere rastlanmıştır. Fakat bu sayılan β -TCP fazları dışında diğer hiçbir sıcaklık ve kompozisyonda hidroksiapatit dışında bir faza rastlanmamıştır. Hatta JCPDS kartlarından HA'ya ait olan kart ile yapılan karşılaştırmalarda %100 bir uyum görülmüştür. Bu da, tüm bu üretim aşamaları sonucunda her sıcaklık ve kompozisyon için HA'ların başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermektedir.

Şekiller 4.3-4.6'teki XRD eğrileri kullanılarak farklı sıcaklıklarda saf HA ve Y^{3+} ve F^- eklenmiş HA'ların hegzagonal kafes parametreleri ve birim hücre hacimleri hesaplanabilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen 2θ ve (hkl) değerlerini yukarıdaki formüller (Formüller: 3.3-3.5) yerlerine koyarak Tablo 4.2'te özetlenen kafes parametreleri elde edilmiştir.

Tablo 4.2'te görüldüğü gibi saf HA'nın hegzagonal kafes parametrelerinin Y^{3+} ve F^- iyonlarının eklenmesi ile her sıcaklık için değiştiği görülmektedir. Tabloya baktığımızda bu değişimin genellikle bir düşüş şeklinde ve bu düşüşün "a" parametresi için "c" parametresine göre daha belirgin olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak da tüm malzemelerin birim hacimleri de azalmaktadır. Eklenen Y^{3+} ve F^- miktarları arttıkça latis parametrelerindeki düşüşün de arttığı gözlemlenmiştir. Bu düşüşler göstermektedir ki HA'ya eklenen iyonlar öngörüldüğü gibi malzeme içerisinde diğer iyonlarla yer değiştirerek HA'nın hegzagonal birim hacminin küçülmesine neden olmuşlardır. Y^{3+} iyonunun Ca^{2+} ile ve F^- iyonunun da OH^- iyonu ile yer değiştirmesi beklenmektedir.

Y^{3+} ve F^- iyonlarının boyutlarının Ca^{2+} ve OH^- iyonlarından daha küçük olmasından dolayı bunların malzemeye eklenmesi ve yer değiştirmeleri ile kafes parametrelerinde bir düşüş tahmin edilebilir bir durumdur. Y^{3+} ve Ca^{2+} iyonlarının iyonik yarıçapları sırasıyla 0,9 Å ve 1,0 Å'dur [66]. OH^- ve F^- iyonlarınınkiler ise sırasıyla 1.68 Å ve 1.32 Å'dur [55, 86]. Kafes parametrelerindeki bu düşüşün daha çok flor iyonunun etkisinden olduğu düşünülmektedir, çünkü OH^- ve F^- iyonlarının iyonik yarıçapları arasındaki fark diğer ikisinininkinden daha fazladır.

Şekiller 4.3-4.6'larda verilen X-ışını difraksiyon çizgileri kullanılarak Tablo 4.3'te gösterilen değerler HA'nın farklı sıcaklıklarda hesaplanmış tane boyutlarıdır.

Tablo 4.2. Üretilen malzemelerin hegzagonal kafes parametreleri ve bu parametrelerdeki ve hacimlerdeki değişimler: a) 900°C sinterlenen numuneler, b) 1100°C sinterlenen numuneler, c) 1300°C sinterlenen numuneler.

a)

Sinterleme Sıcaklığı:	900°C				
	a (Å)	c (Å)	Δa (Å)	Δc (Å)	ΔV (Å ³)
HA	9,417	6,879	0	0	0
2.5YFHA	9,400	6,869	-0,0163	-0,0097	-7,70
5YFHA	9,396	6,865	-0,0208	-0,0144	-10,26
7.5YFHA	9,394	6,865	-0,0227	-0,0141	-10,80

b)

Sinterleme Sıcaklığı:	1100°C				
	a (Å)	c (Å)	Δa (Å)	Δc (Å)	ΔV (Å ³)
HA	9,413	6,875	0	0	0
2.5YFHA	9,406	6,874	-0,0077	-0,0011	-2,82
5YFHA	9,408	6,877	-0,0057	0,0022	-1,40
7.5YFHA	9,384	6,860	-0,0294	-0,0150	-13,27

c)

Sinterleme Sıcaklığı:	1300°C				
	a (Å)	c (Å)	Δa (Å)	Δc (Å)	ΔV (Å ³)
HA	9,412	6,876	0	0	0
2.5YFHA	9,391	6,866	-0,0215	-0,0096	-9,40
5YFHA	9,393	6,867	-0,0191	-0,0087	-8,40
7.5YFHA	9,387	6,866	-0,0248	-0,0106	-10,70

Tablo 4.3. Saf HA ve Y^{3+} ve F^- eklenmiş HA'ların farklı sıcaklıklarda sinterlenmeleri sonucunda Sherrer formülü kullanılarak hesaplanan tane boyutları "D" (nm).

	900°C	1100°C	1300°C
HA	47.7	53.4	62.8
2.5YFHA	51.2	52.2	58.9
5YFHA	46.5	50.5	57.9
7.5YFHA	35.9	47.7	53.4

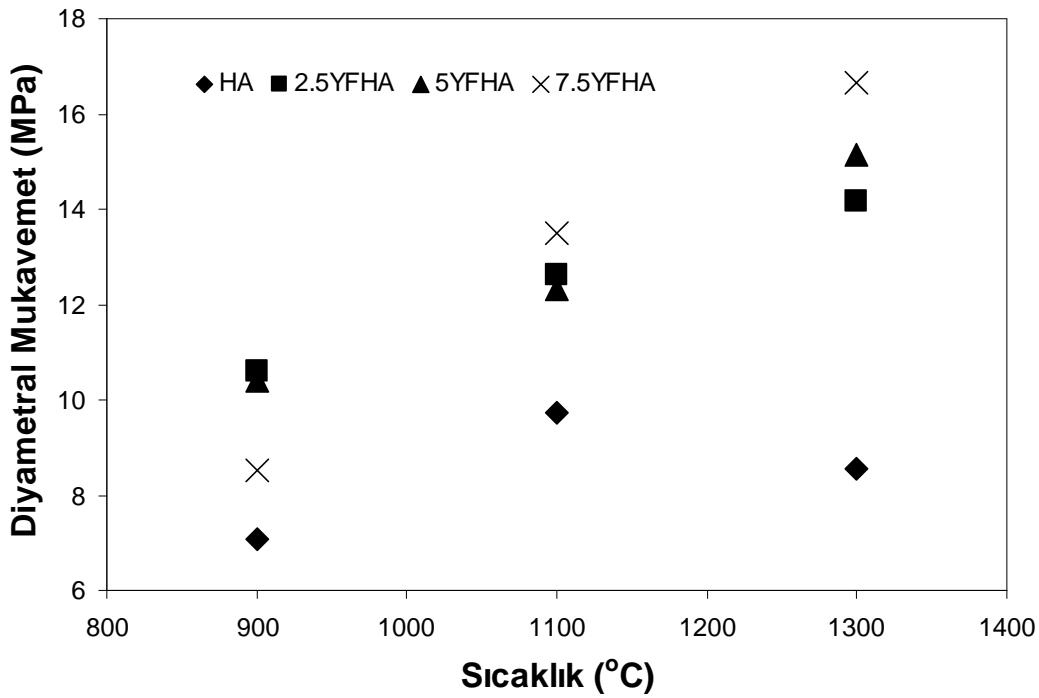
Tablo 4.3'teki Sherrer denklemi kullanılarak hesaplanan "D" değerleri göstermektedir ki 900°C, 1100°C ve 1300°C'de sinterlenen tüm malzemelerin tane boyutları nano boyuttur. Tablo 4.3'ten de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça çok belirgin bir şekilde olmasa da malzemeleri tane boyutları da artmaktadır. Bu metod ile hesaplanan tane boyutlarının güvenilirliği, taramalı elektron mikroskopu ile yapılan tane boyutu ölçümlerine göre daha zayıf kalmakla birlikte, malzemenin tane boyutları hakkında hızlı ve pratik olarak hesap yapılabilmesine katkıda bulunmaktadır.

Bu tablodan çıkarabileceğimiz diğer bir sonuç da HA'ya eklenen Y^{3+} ve F^- iyonları malzemenin tane boyutlarını düşürmektedir. Hatta eklenen madde miktarı arttıkça bu düşüş de artmaktadır. En küçük tane boyutuna sahip malzeme 35.93 nm tane boyutu ile 900°C sinterlenen 7.5YFHA'dır. Bu sonuçlara göre, üretmiş olduğumuz saf HA ve Y^{3+} ve F^- eklenmiş HA'lar, insan kortikal kemiğinde bulunan apatit kristallerinin boyutları (20–70 nm) ile tutarlılık göstermektedir [8, 9, 13]. Bu üretim metodu ve eklenen maddeler ile hem nano boyutta hem de insan kemiğindeki apatit parçacık boyutlarına ile tutarlı hidroksiapatitler elde edilmiştir.

4.3. Malzemelerin Diyametral Mukavemet Test Sonuçları

Şekil 4.7 saf HA ile Y^{3+} ve F^- eklenmiş HA'ların sıcaklık karşısında diyametral mukavemetlerindeki değişimi göstermektedir. Şekil 4.8'de ise saf HA ile Y^{3+} ve F^- eklenmiş HA'ların yoğunluklarındaki değişim ile diyametral mukavemetlerindeki farklılaşma gösterilmektedir. Şekil 4.7'teki grafiği incelediğimizde genel eğilimin tüm kompozisyonlar için sıcaklık arttıkça diyametral mukavemetlerinin de arttığı yönündedir. Sadece saf HA eğrisinde bu eğilimin 1300°C için farklılaştığı gözlemlenmektedir.

900°C’de sinterlenen malzemelere baktığımızda en düşük mukavemeti gösteren 7 MPa civarındaki saf HA olduğu görülmektedir. Bu sıcaklıktaki en yüksek mukavemet ise 10.6 MPa ile 2.5YFHA’nındır. 1100 ve 1300°C’de sinterlenen saf HA’lar diğer malzemeler arasında en düşük mukavemete sahiptir. Y³⁺ ve F⁻ iyonlarının HA’ya eklenmesi ile diyametral mukavemetlerde her sıcaklık için belli miktarlarda artış olmaktadır. 1100 ve 1300°C’lerdeki en yüksek diyametral mukavemete sahip olan malzeme 7.5YFHA’dır. Şekil 4.7’ye baktığımızda HA’ya eklenen malzemelerin diyametral mukavemet üzerinde kompozisyon değişimiyle doğru orantılı bir artış etkisinin olduğu söylenemez.

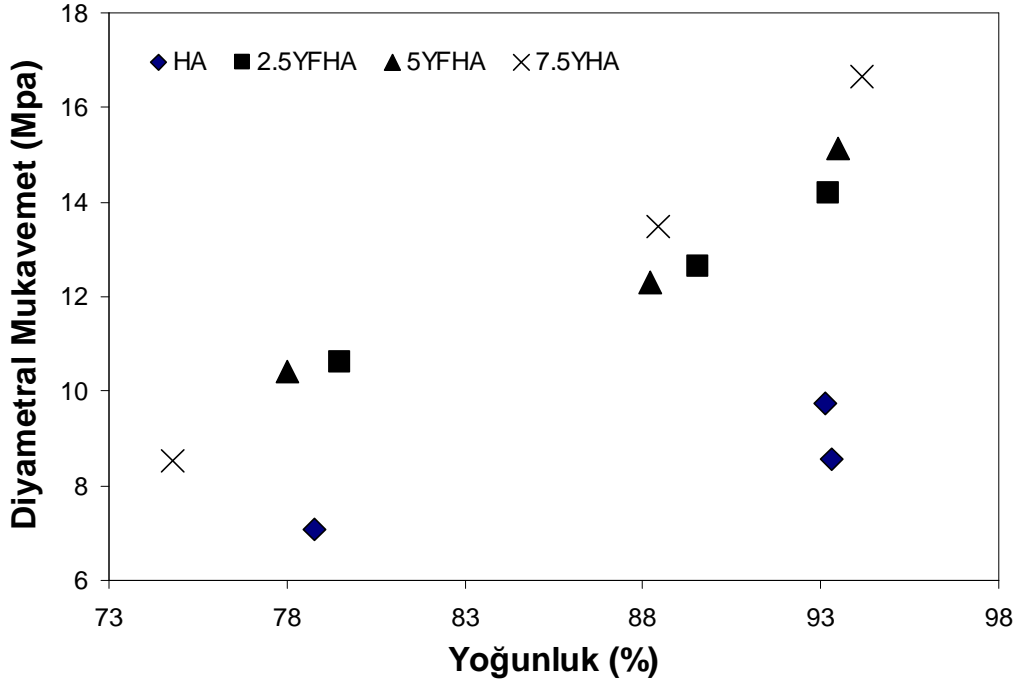


Şekil 4.7. Saf HA ile Y³⁺ ve F⁻ eklenmiş HA’ların sıcaklıkla diyametral mukavemet değişimi.

Şekil 4.8’i incelediğimizde ise malzemelerdeki yoğunluk artışının diyametral mukavemeti arttırdığını görmekteyiz. Ayrıca bu grafikten görülmektedir ki Y³⁺ ve F⁻ eklenmiş HA’ların diyametral mukavemetleri, yoğunlukları saf HA’dan daha düşük olsa dahi saf HA’nın mukavemetine göre daha yüksektir. Buradan da görüldüğü gibi HA’ya eklenen iyonlar bu malzemenin daha düşük yoğunluklarda bile daha yüksek mukavemete sahip olmasını sağlamaktadır.

Bu sonuçlardan görüldüğü üzere diyametral mukavemeti etkileyen ana faktör gözeneklilik miktarıdır. HA içindeki gözeneklilik miktarının artmasıyla yapı içerisindeki

boşluklar, mukavemeti azaltan gerilme artırıcı faktörler şeklinde davranmaktadır [87]. Diyametral testte test edilen numuneler genelde iki parça şeklinde kırılmaktadır. Gözenekliğe ilave olarak faz geçişleri ve tane boyutları da mekanik özellikleri etkilemektedir [88].



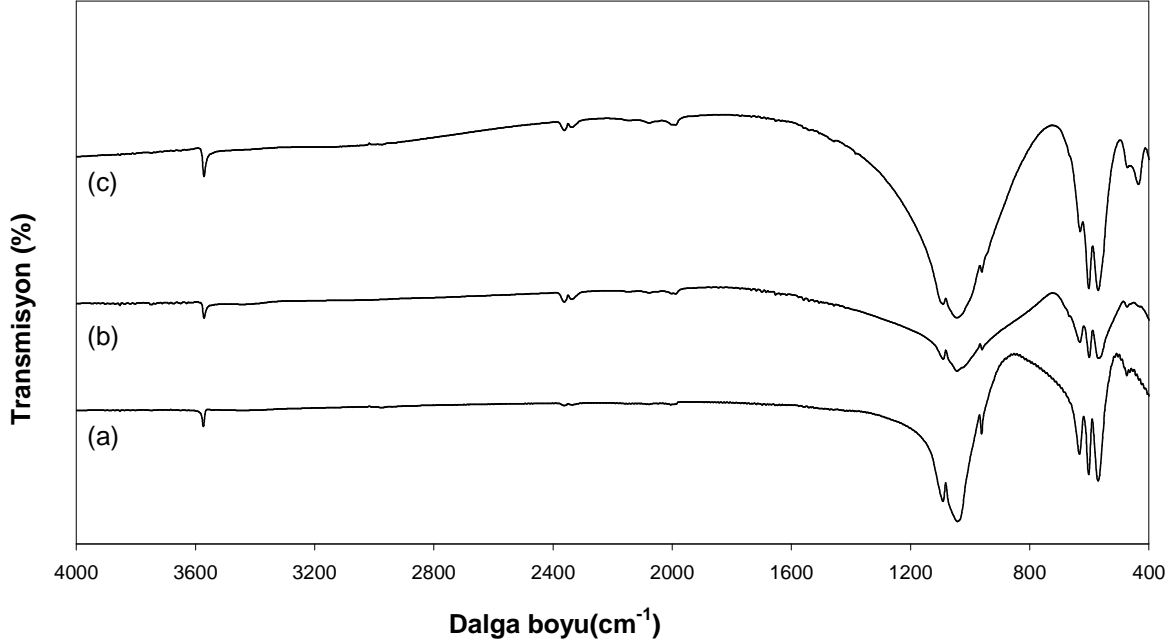
Şekil 4.8. Saf HA ile Y^{3+} ve F^- eklenmiş HA'ların yoğunluklarına göre diyametral mukavemet değişimleri.

4.4. FTIR ve RAMAN Spektroskopileri

900°C, 1100°C, 1300°C'de sinterlenmiş saf ve Y^{3+} ve F^- iyonları ilave edilmiş HA'ların FTIR spektralleri Şekil 4.9-4.12'te verilmiştir. Tüm malzemeler için HA'nın temel karakteristik eğrileri aynen görülmektedir. Frekansları ve bunlara karşılık gelen bant ve bağların bir özeti Tablo 4.4'de verilmiştir.

3572 cm^{-1} civarındaki OH^- grubuna ait olan çekme bantları ile PO_4^{3-} bantları tüm malzemelerin spektrallerinde görünmektedir. 630 cm^{-1} civarlarında beliren OH^- librasyon bantları ise sadece 900°C ve 1100°C'de (azda olsa 1300°C'de) sinterlenen saf HA'da görünmektedir. 1300°C'de sinterlenen saf HA'daki 630 cm^{-1} 'deki OH^- librasyon bantlarının şiddetinin azalması, bu HA'nın iç yapısının bozulmaya başlaması ve oksapatite dönüşmeye başladığı anlamına gelmektedir. Ancak, 630 cm^{-1} civarlarında beliren OH^- librasyon bantları ise iyon ilave edilmiş HA'ların hiçbirinde mevcut değildir. Bu ise, OH^- iyonlarının HA'nın

$A_{10}(BO_4)_6(C)_2$ kimyasal formülünde bulunan C iyonu için %100 miktarda değilde F^- iyonları ile birlikte HA'nın kimyasal formülündeki C iyonlarını içerdiği görülmektedir.



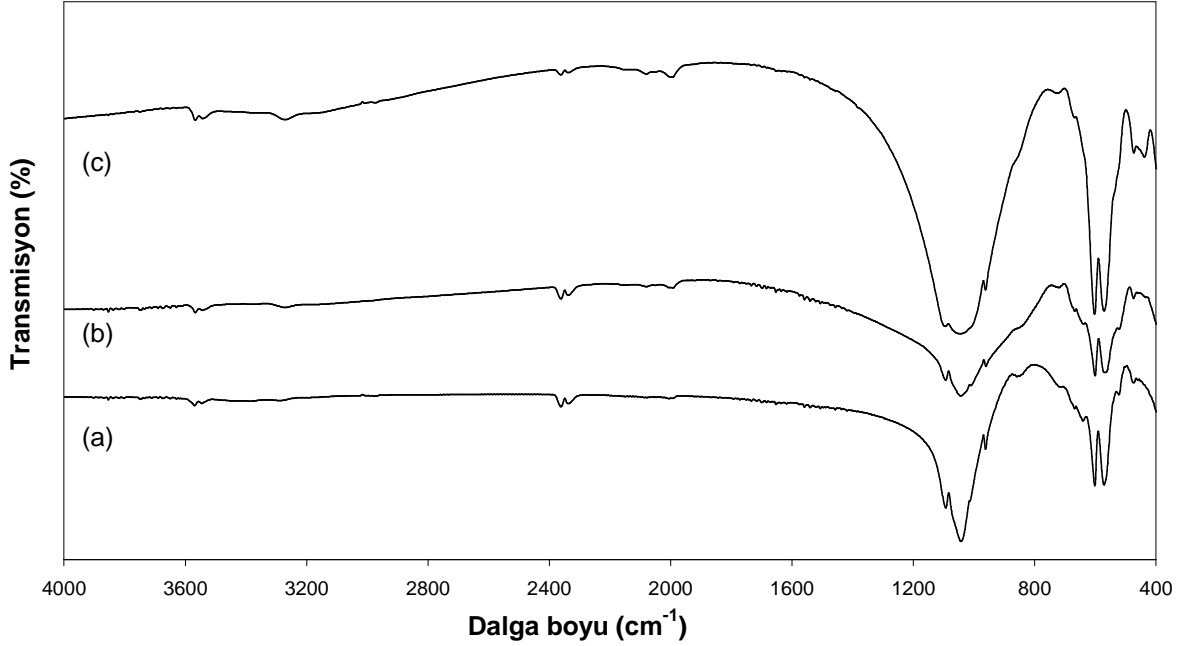
Şekil 4.9. Saf HA'nın FTIR metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş HA.

Apatitlerdeki F^- iyon miktarı arttıkça 735 cm^{-1} , 715 cm^{-1} , ve 670 cm^{-1} dalga boylarında bulunan librasyon bantları yükselir. Bu yükselme saf HA hariç, bütün Y^{3+} ve F^- ilave edilmiş HA'larda gözlemlenmiştir.

Bütün HA'larda, PO_4^{3-} grubuna ait olan bantlar 962, 474, 1087 ve 601 cm^{-1} dalga boyları dolaylarında bulunmaktadır. İyon eklenmiş HA'ların FTIR spektraları, bir kaç fazlıdan F^- bantları dışında, saf HA'ninkine çok büyük benzerlikler göstermektedir. Saf HA dışında beliren bu bantlar göstermektedir ki eklenen F^- iyonları OH^- iyonları ile yer değiştirebilmiş ve flor eklenmiş HA'lar elde edilmiştir.

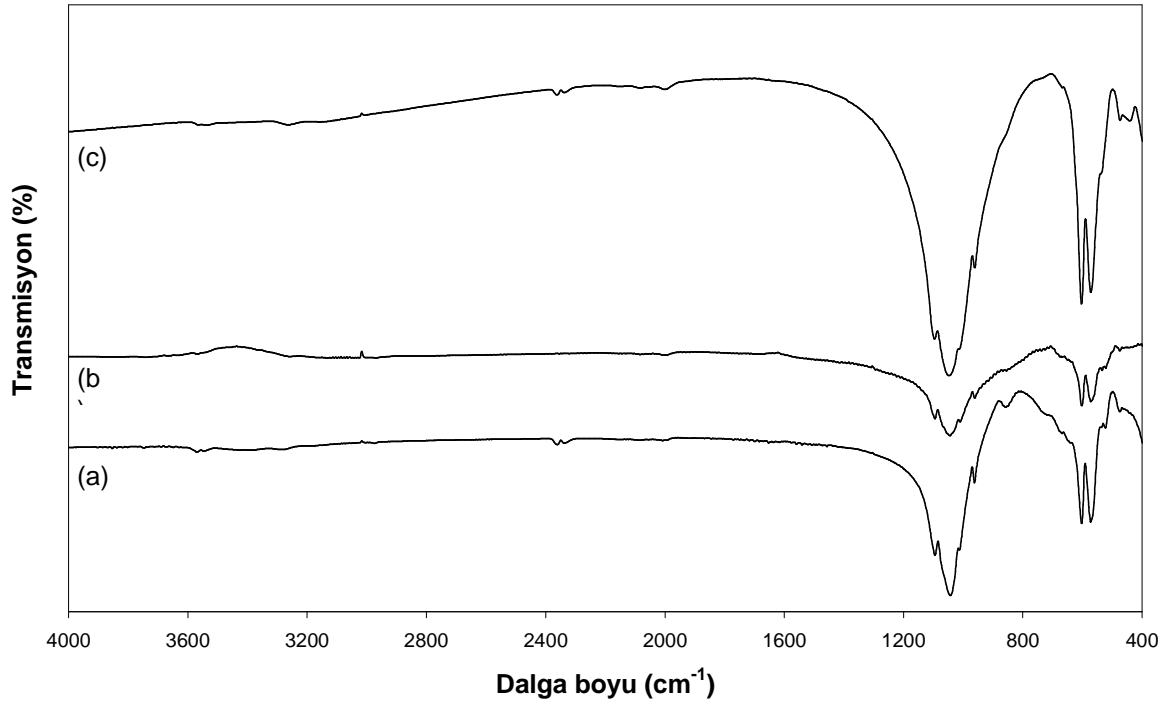
Saf HA'larda açıkça gözüken 630 cm^{-1} civarındaki OH^- librasyon bandı, iyon ilave edilmiş HA'larda mevcut değildir. 3572 cm^{-1} civarındaki OH^- çekme bantlarında ise azalma gözlemlenmiştir. Şekil 4.10-4.12'lerde görülebileceği gibi iyon eklenmiş HA'ların spektralarında 3543, 700 and 858 cm^{-1} civarlarında F^- bantları mevcuttur. Bu ise, F^- iyonlarının HA iç yapısı içerisinde mevcut olduğunu göstermektedir. HA'yı belirleyen

karakterlerin sinterleme sıcaklığının 900°C'den 1300°C'ye artışı ile pek değişmediği görülmektedir. Sadece HA'nın içyapısında meydana gelen iyon yer değiştirmelerinden dolayı FTIR spektralarında fazladan tepeler görünmeye başlanmıştır.



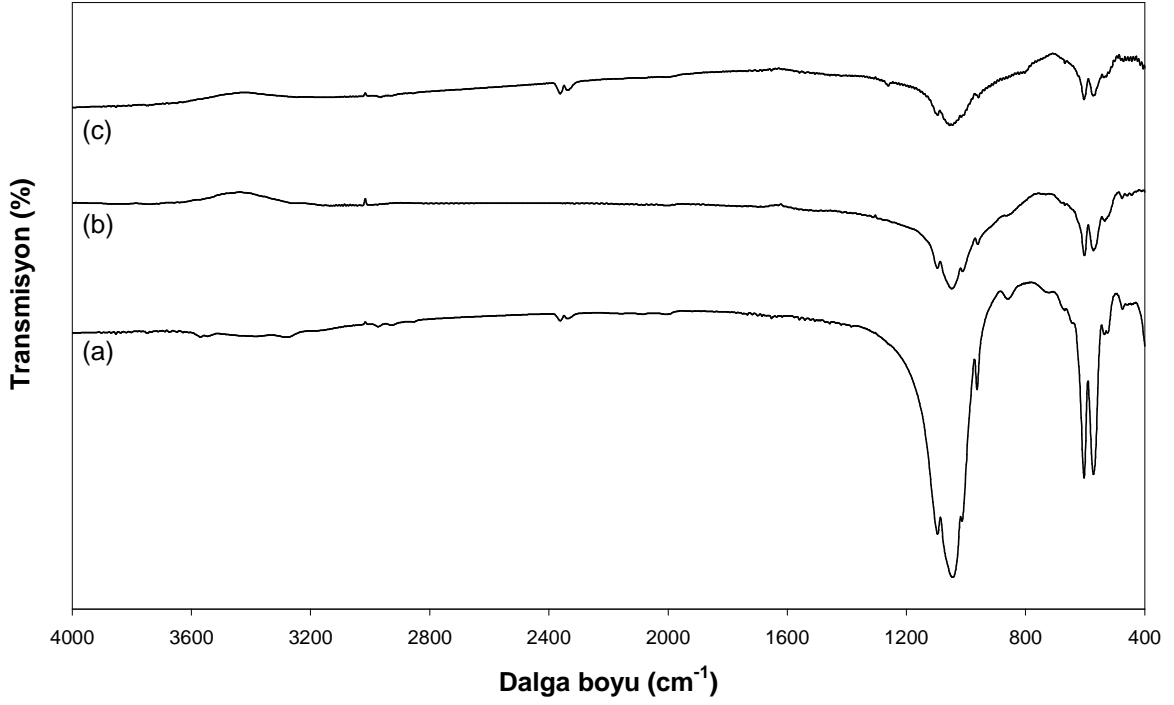
Şekil 4.10. 2.5YFHA'nın FTIR metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA.

900°C, 1100°C ve 1300°C'lerde sinterlenmiş saf ve Y³⁺ ve F⁻ iyonları eklenmiş HA'ların Raman spektraları Şekil 4.13-4.16'te verilmiştir. Tüm malzemeler için HA'nın temel karakteristik eğrileri çoğunlukla görülmektedir. Raman frekansları ve bunlara karşılık gelen bant ve bağların bir özeti Tablo 4.5'da verilmiştir.



Şekil 4.11. 5YFHA'nın FTIR metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektralar: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA.

Raman dalga boyu 337 cm⁻¹'de olan saf HA'ya ait Ca-OH çekme bandı, 900°C, 1100°C ve 1300°C'lerde sinterlenen saf HA'da bulunmasında rağmen, Bu bandın iyon ilave edilmiş HA'larda olmaması, bu apatitlerde OH⁻ iyonlarının F⁻ iyonları ile yer değiştirdiği anlamına gelmektedir [91]. Ancak FTIR sonuçlarındanda görüldüğü üzere, bu yer değiştirmenin sonucunda iyon ilave edilmiş HA'larda hem OH⁻ hemde F⁻ iyonlarının birlikte bulunduğu düşüncesindeyiz.



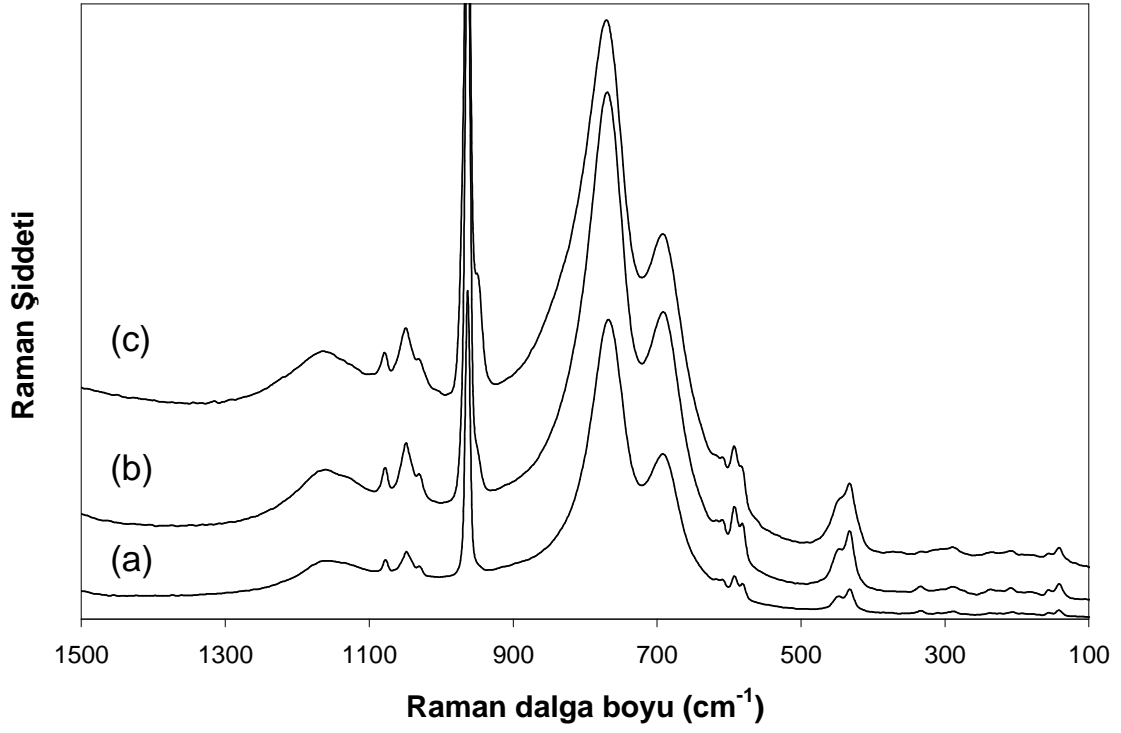
Şekil 4.12. 7.5YFHA'nın FTIR metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektraller: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA.

Ayrıca Ca-F bandına ait olan 325 cm⁻¹, 310 cm⁻¹, 304 cm⁻¹, ve 267 cm⁻¹'lerde bulunan Raman dalga boyları saf HA'da bulunmamlarına rağmen, iyon ilave edilmiş HA'larda mevcuttur. En siddetli PO₄³⁻ Raman bandı ise, saf HA için 951 cm⁻¹ dalga boyunda olmasına rağmen, iyon ilave edilmiş HA'larda ise 958 cm⁻¹ civarlarında bulunmaktadır.

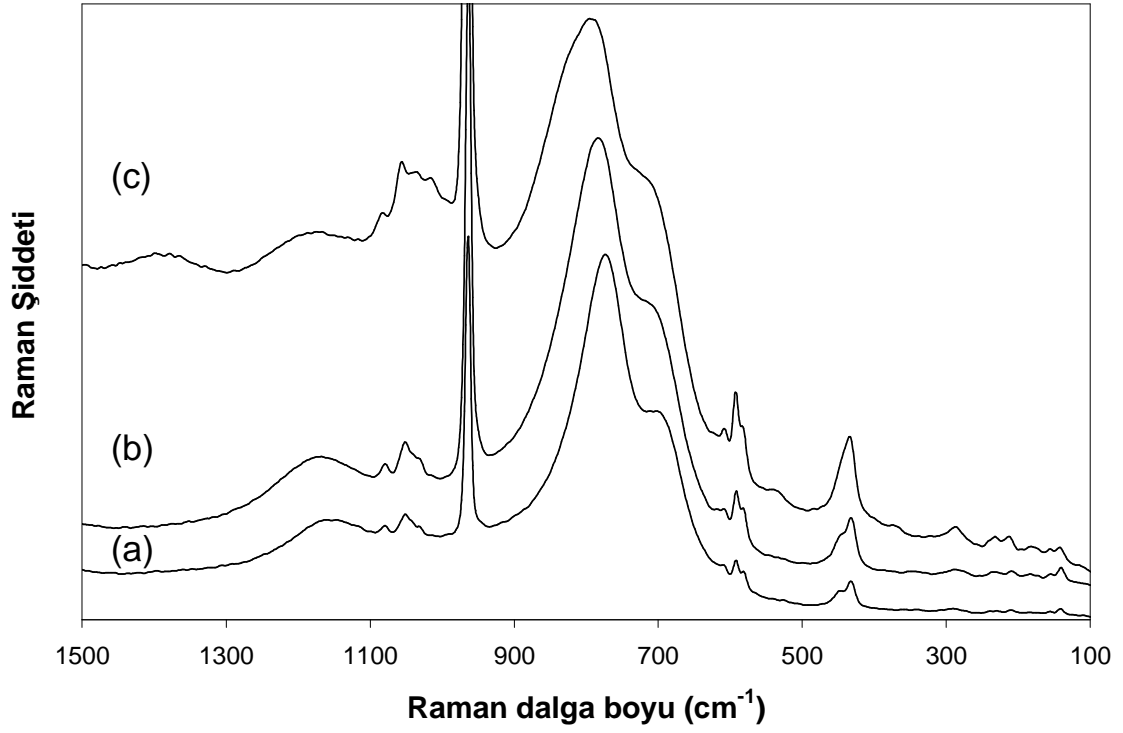
Tablo 4.4. Saf hidroksiapatit ve FHA için FTIR frekansları ve bunlara karşılık gelen bant ve bağlar [89, 90].

Malzeme	Bağlar	Mod	Frekanslar (cm ⁻¹)	
HA	OH ⁻ stretching		3572	
	OH ⁻ libration		630	
	PO ₄ ³⁻		v ₃	1087, 1046, 1072 (sh), 1032 (sh)
			v ₁	962
			v ₄	601, 571
			v ₂	474, 462 (sh)
	Ca-PO ₄		290, 275, 228	
Ca-OH stretching	v ₃	355, 343, 337		
FHA	Ca-F	v ₃	325	
	Ca-PO ₄		280, 230	
	PO ₄ ³⁻		v ₁	962
			v ₂	470, 460
			v ₃	1090, 1040, 1032
			v ₄	601, 575, 560

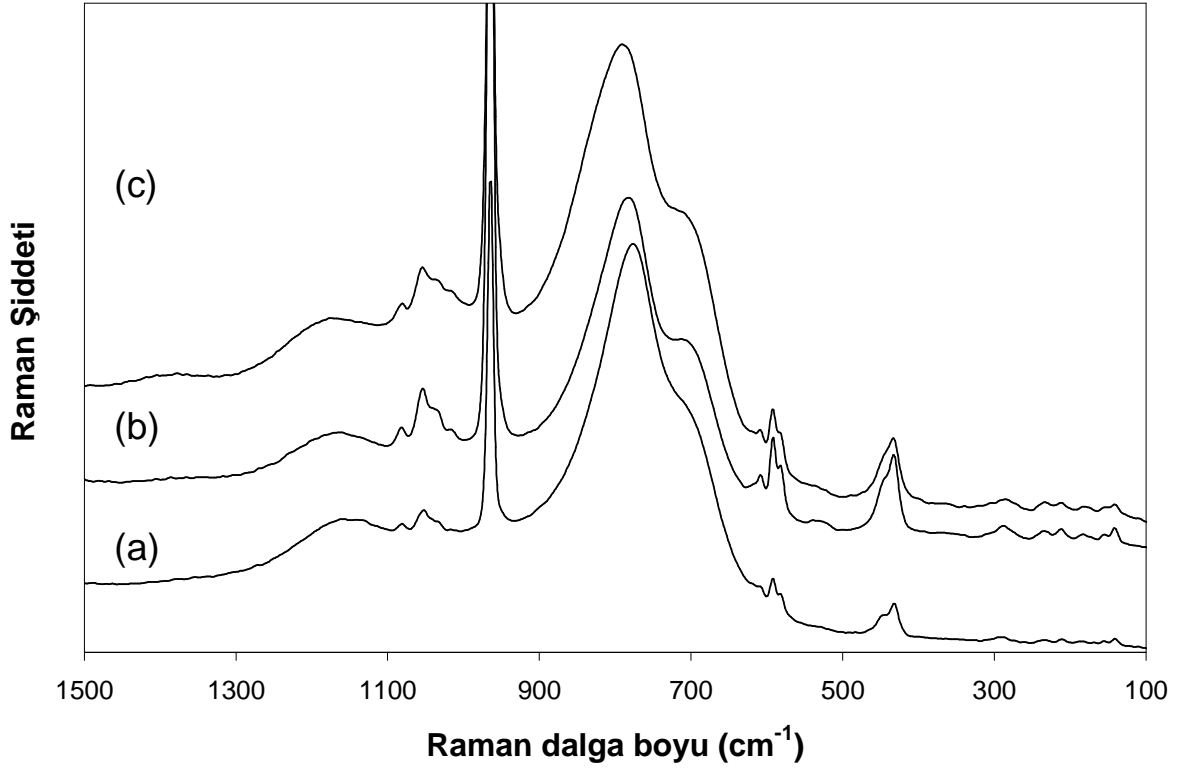
sh: shoulder; v₁: stretching mode; v₂: doubly bending mode; v₃: triply degenerate antisymmetric stretching mode; v₄: triply degenerate bending mode.



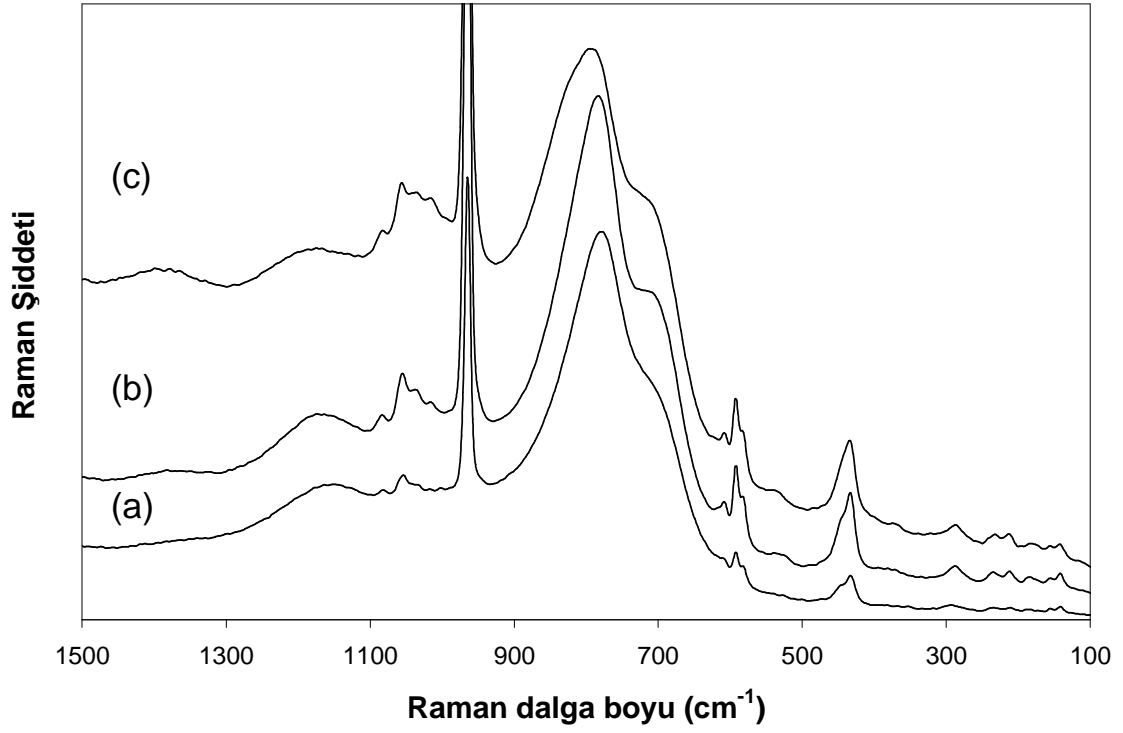
Şekil 4.13. Saf HA'nın Raman metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektraller: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş HA.



Şekil 4.14. 2.5YFHA'nın Raman metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektraller: a) 900°C 'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, b) 1100°C 'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, c) 1300°C 'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA.



Şekil 4.15. 5YFHA'nın Raman metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektraller: a) 900°C 'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, b) 1100°C 'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, c) 1300°C 'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA.



Şekil 4.16. 7.5YFHA'nın Raman metodu ile karakterizasyonu sonucu oluşan spektraller: a) 900°C 'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, b) 1100°C 'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, c) 1300°C 'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA.

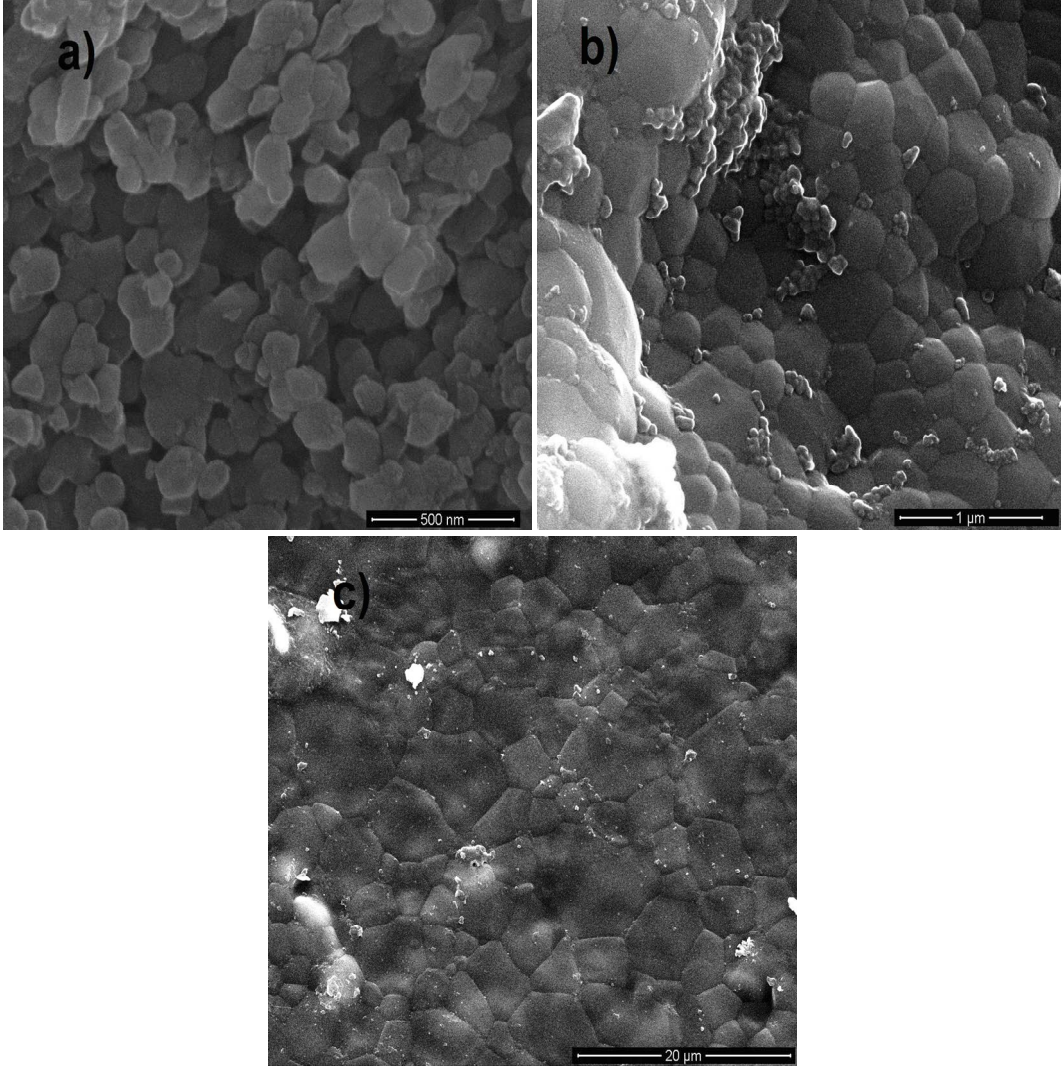
Tablo 4.5. Saf hidroksiapatit ve FHA için Raman frekansları ve bunlara karşılık gelen bant ve bağlar [89,90].

Malzeme	Bağlar	Mod	Frekanslar (cm ⁻¹)
HA	OH ⁻ libration		630
	PO ₄ ³⁻	v ₃	1046, 1039, 1028
		v ₁	948
		v ₄	593, 580
		v ₂	432
	Ca-PO ₄		175, 157, 153, 140, 132, 114
Ca-OH stretching	v ₃	355, 337	
FHA	Ca-F	v ₃	325, 310, 304, 267
	Ca-PO ₄		280, 230
	PO ₄ ³⁻	v ₁	963
		v ₂	451, 446, 429
		v ₃	1078, 1051, 1059, 1033, 1040,
		v ₄	606, 591, 615, 580, 591

sh: shoulder; v₁: stretching mode; v₂: doubly bending mode; v₃: triply degenerate antisymmetric stretching mode; v₄: triply degenerate bending mode.

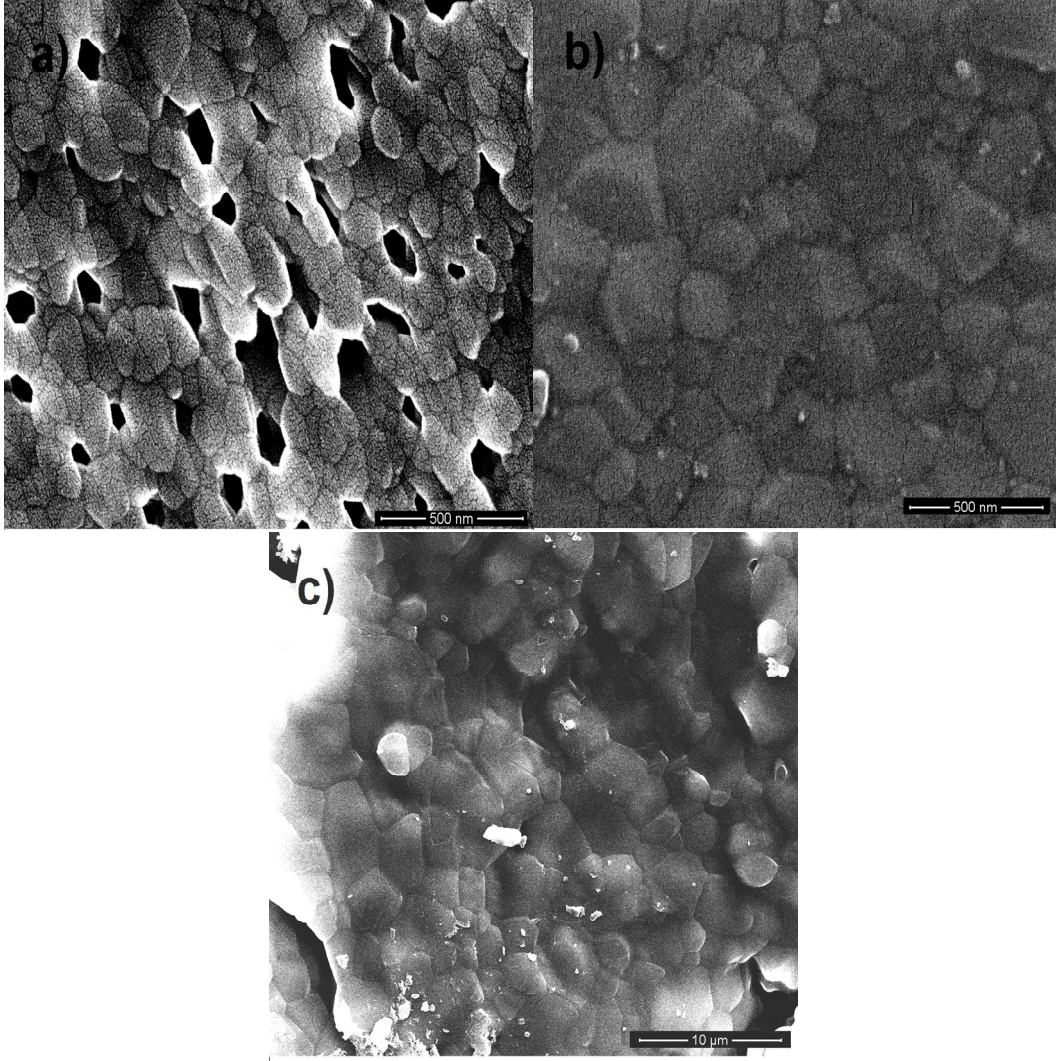
4.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi

900°C, 1100°C and 1300°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA’ların SEM ile çekilmiş fotoğrafları Şekiller 4.17-4.20’de verilmiştir. SEM görüntülerinden fark edildiği gibi sıcaklık ve eklenen iyonların malzemelerin tane boyutuna büyük etkileri vardır. Tane boyutları, sinterleme sıcaklığının artması ile beraber artmaktadır. 1300°C sinterlenen tüm HA’lar en büyük tane boyutlarına sahiptirler. Yine de eklenen Y³⁺ ve F⁻ iyonları sinterleme sıcaklığı karşısında tane boyutlarındaki bu büyümeyi bir yere kadar engelleyebilmektedirler (bknz. Şekil 4.17-4.20). 1300°C’de sinterlenen malzemelere rağmen, 900°C ve 1100°C sıcaklıklarda sinterlenen saf ve iyon ilave edilmiş HA’lar daha benzeş ve üniform tane boyutlarına sahiptirler.



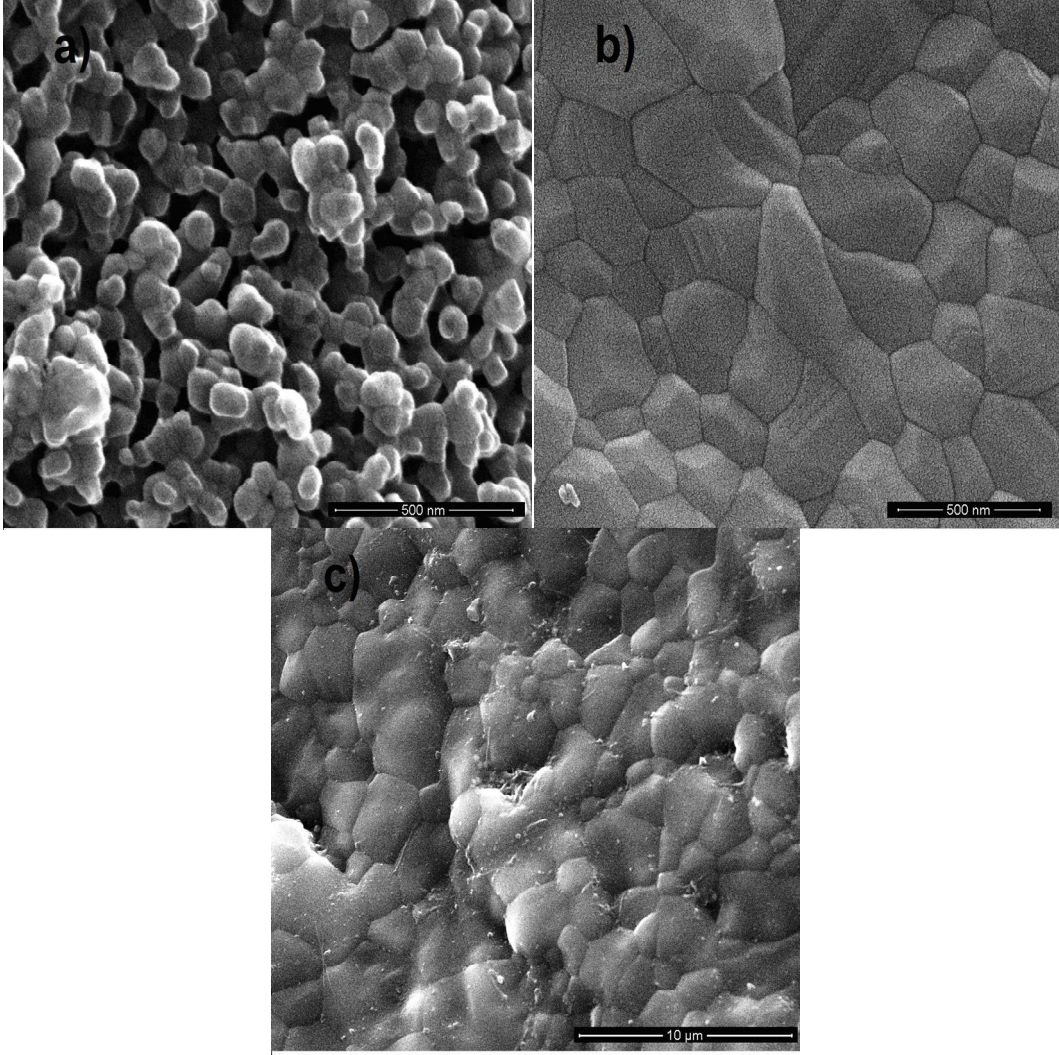
Şekil 4.17. Saf HA'nın taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş HA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş HA.

Tablo 4.6'da sıcaklığın ve eklenen iyonların HA'ların tane boyutları üzerine etkileri özetlenmiştir. 900°C and 1100°C'lerde yapılan sinterlemeler sonucunda, bütün HA'ların tane boyutları nano boyuttadır. Özellikle 900°C'de yapılan sinterleme sonucunda bütün HA'ların tane boyutlarının 100 nm'den ufak olduğu görülmüştür. 1300°C'de sinterlenen HA'ların ise tane boyutları mikron düzeyine çıkmıştır. Ayrıca F⁻ iyonlarının miktarının sabit kalmasına rağmen, Y³⁺ iyonları ilave edilmiş HA'larda Y³⁺ miktarı arttıkça daha ufak tane boyutlarının üretilebildiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.18. 2.5YFHA'nın taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 2.5YFHA.

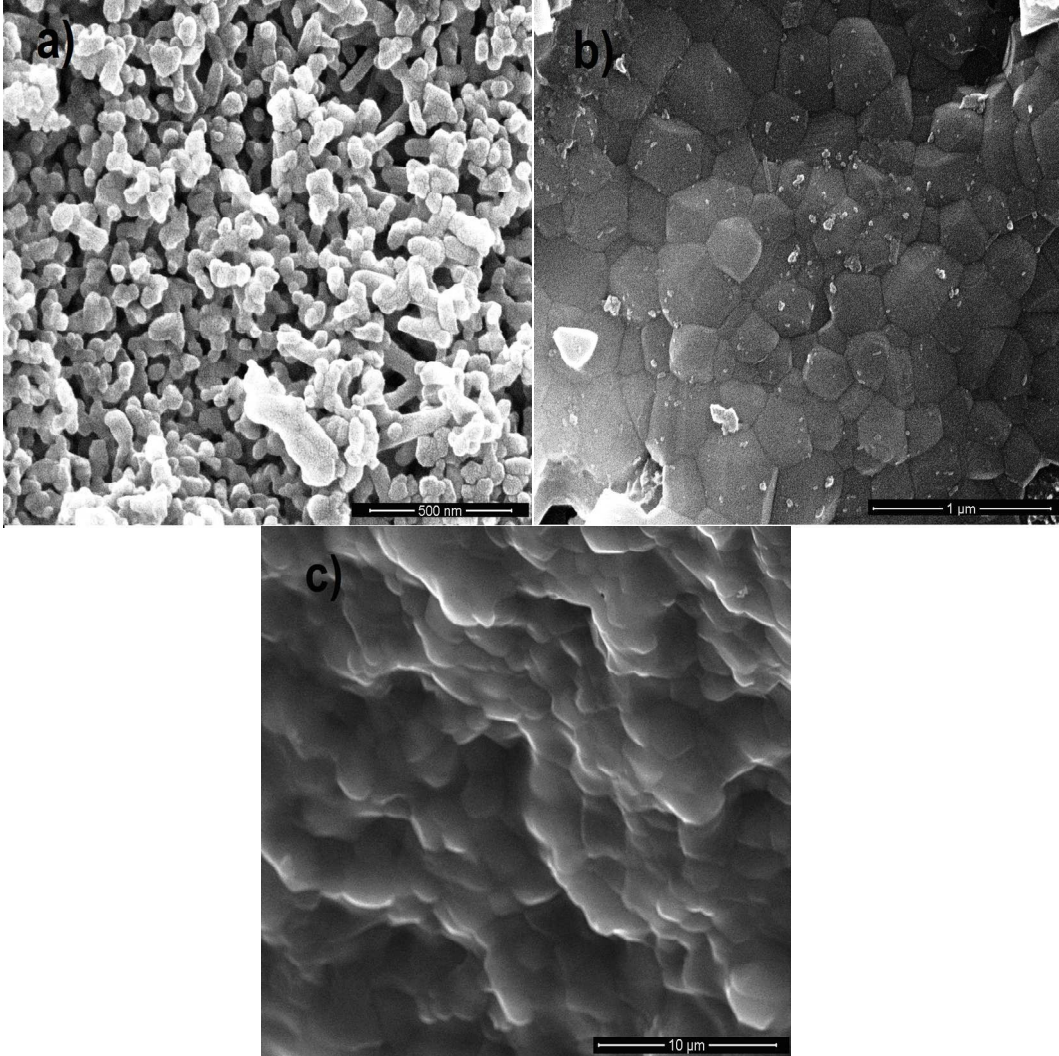
Tablo 4.6'dan görüldüğü üzere, saf HA'ların tane boyutları, iyon ilave edilmiş HA'lara göre daha büyüktür. Sinterleme sıcaklığı 900°C'den 1300°C'ye çıkarıldığında, tane boyutları sırasıyla saf HA için 40 kat, iyon ilave edilmiş HA'lar için ise ortalama 30 kat artmıştır. Bu ise iyon ilave edilmiş HA'ların daha ufak tane boyutlarında üretilebileceklerini göstermektedir.



Şekil 4.19. 5YFHA'nın taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 5YFHA.

Bütün malzemelerdeki tane boyutlarının 1100°C'den 1300°C'ye geçişte çok fazla miktarlarda artmasının sebebi ise 1200°C'nin üzerindeki sinterleme sıcaklıklarında HA'nın tane büyümesine etkisi olan aktivasyon enerjisinin dahada azalmasıdır [92]. Örneğin, bu araştırma projesinde üretilmiş olan HA, 2.5YFHA, 5YFHA ve 7.5YFHA'ların sinterleme sıcaklıklarının 1100°C'den 1300°C'ye yükseltilmesi sonucunda tane boyutlarında sırasıyla 12.9, 10.7, 8.9 ve 8.2 kat artış olmuştur. Bu ise iyon ilave edilmiş HA'larda F⁻ miktarları sabit tutulmasına rağmen, Y³⁺ miktarlarının artırılması ile daha ufak tane boyutlarına sahip HA'ların üretilebileceğini göstermiştir. Bu sonuçlarımızı destekleyen sonuçlar ise şöyledir: daha önce mikron tane boyutlarına sahip saf HA'ların sinterleme sıcaklıklarının 1150°C'den

1300°C'ye çıkarılması ile tane boyutları 0.88 μm 'den 7.13 μm 'ye çıkmıştır ve bu ise 8.1 kat bir tane büyümesidir [93].



Şekil 4.20. 7.5YFHA'nın taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları: a) 900°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, b) 1100°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA, c) 1300°C'de 1 saat sinterlenmiş 7.5YFHA.

SEM fotoğraflarından ve Tablo 4.6'dan görüldüğü üzere, 900°C ve 1100°C'lerde yapılan sinterlemeler sonucunda nanomalzemeler elde edilmiştir. XRD sonuçlarını ve Sherrer formülünü kullanarak hesaplanan tane boyutu hesaplamalarına nazaran, SEM sonuçlarından hesaplanan tane boyutlarının daha gerçekçi oldukları düşüncesindeyiz. Çünkü SEM fotoğrafları ile direkt olarak hesaplanan tane boyutları, Sherrer denklemi ile dolaylı yoldan hesaplanan tane boyutlarına göre, daha somut sonuçlar çıkarmamızı sağlamıştır.

Tablo 4.6. Saf HA ve Y^{3+} ve F^- eklenmiş HA'ların, 900°C, 1100°C, ve 1300°C'lerde 1 saat sinterlenmeleri sonucunda oluşan tane boyutları. Not: Tane boyutları Şekil 4.17-4.20'de bulunan taramalı elektron mikroskobu fotoğraflarından hesaplanmıştır.

	Ortalama Tane Boyutu (nm)		
	900°C	1100°C	1300°C
HA	86.6	271.0	3487
2.5YFHA	82.6	224.0	2409
5YFHA	56.3	204.8	1832
7.5YFHA	51.4	200.7	1641

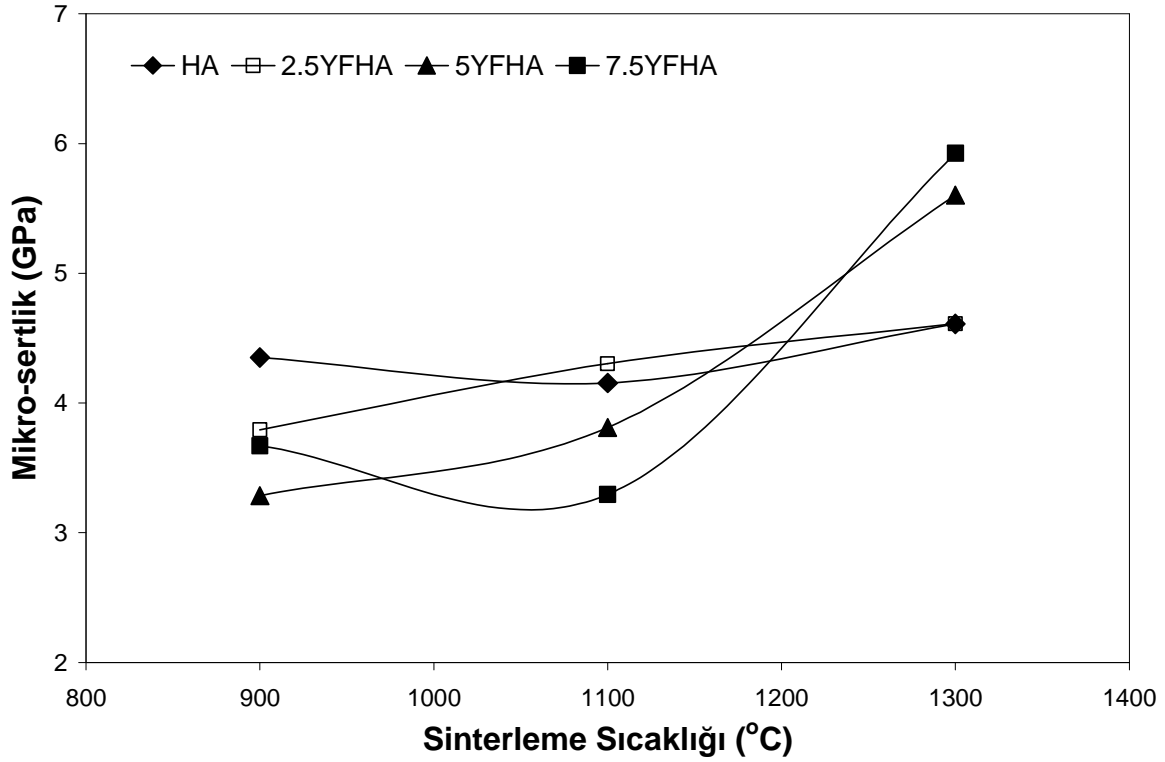
Ayrıca, daha önceki literatürden, saf HA'ya ilave edilmiş olan flor iyonlarının artması ile bu apatitlerde bir tane büyümesinin olduğu görülmüştür [94]. Saf HA'lara tek başına ilave edilen Y^{3+} iyonlarının ise HA'larda tane ufalmasına katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir [56, 57]. Bu ise bu projede birlikte flor ve itriyum ilave edilmiş HA'lardaki tane ufalmasının daha ziyade Y^{3+} iyonlarının artması ile (2.5YFHA'dan 7.5YFHA'ya doğru) dahada belirginleşmesini desteklemektedir.

4.6. Vickers Mikro-sertlik

Sinterleme sıcaklıklarının (900°C, 1100°C ve 1300°C) ve eklenen iyonların (Y^{3+} ve F^- iyonları) HA'ların mikro-sertlikleri üzerindeki etkileri Şekil 4.21'de gösterilmektedir. En düşük mikro-sertlik değeri 3.29 GPa'lık değerle 900°C'de sinterlenen 5YFHA'ya ait olduğu görülmektedir. En yüksek değer ise 5.92 GPa ile 1300°C'de sinterlenen 7.5YFHA'nındır. Sinterleme sıcaklığının mikro-sertliğe etkileri daha önce de pek çok defa incelenmiş ve saf HA'nın 1.17-6.86 GPa arasında değişebilen değerlere sahip olduğu görülmüştür [92,95,96].

Mikro-sertlik değerlerinin sinterleme sıcaklığının artışı ile arttığı gözlemlenmiştir. İyon ekleme etkisi göz önünde tutmadan bile baktığımızda 1300°C'de sinterlenen tüm HA'ların yoğunluklarının diğer sıcaklıklardaki HA'lardan daha yüksek olmasından dolayı mikro-sertliklerinin de daha yüksek değerlerde seyrettiği görülmüştür. Bu sonuçlar da göstermektedir ki sıcaklığın artması mikro-sertlik üzerinde belirgin farklar yaratabilmektedir, bunun muhtemel nedeni de daha yüksek sıcaklıklarda sinterlenen malzemelerin

yoğunluklarının da daha yüksek olmasıdır. Bilindiği üzere saf HA'nın kırılma dayanımının yüksek olmasından dolayı yük dayanımı gerektiren yerlerde kullanımı kısıtlıdır, bu yüzden yük dayanımı gerektirebilecek bölgelerdeki kullanımlarında HA'nın sertlik değerlerinin daha kabul edilebilecek orta sertlik değerlerinde olması gerekmektedir.



Şekil 4.21. Saf HA ve Y^{3+} ve F⁻ eklenmiş HA'ların, 900°C, 1100°C, ve 1300°C'lerde 1 saat sinterlenmelerine bağlı olarak gösterdikleri mikro-sertlik değişimleri.

Sıcaklık etkisinin yanı sıra, eklenen iyonların da mikro-sertlik değerlerine etki ettiği görülmektedir. Bu çalışmada esas olarak incelenen konulardan biri de HA içerisine aynı anda katılan itriyum ve flor elementlerinin HA'nın sertliğine olan etkisinin katılan bu elementlerin hangi oranlarda ekleneceği ile bağlantısının olup olmadığıdır. Bu çalışmada hazırlanan ve ölçümleri yapılan tüm saf HA'ların mikro-sertlik değerleri 4.1–4.6 GPa arasındadır. 900°C'de sinterlenen iyon eklenmiş HA'lar 3.3–3.8 GPa arasında değişen mikro-sertlik değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı eğilim 1100°C'de sinterlenen HA'lar için de geçerli olmaktadır. Yalnız bu sıcaklıkta sinterlenen 2.5YFHA'nın mikro-sertlik değeri saf HA'ninkinden biraz daha yüksek çıkmıştır. 1300°C'de sinterlenen HA'lar arasında en düşük mikro-sertlik değerine sahip olan malzeme ise saf HA olmuştur. 1300°C'de sinterlenen

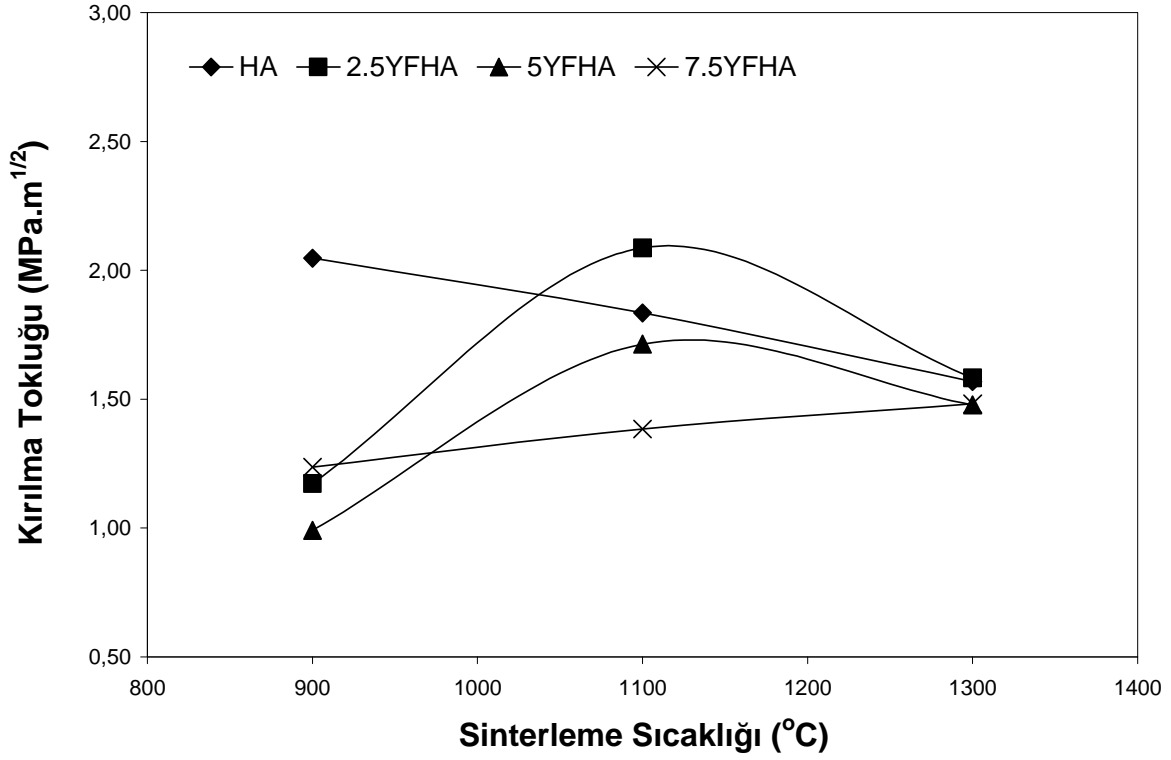
HA'larda eklenen katyon (Y^{3+}) oranı arttıkça mikro-sertlik değerlerinin de arttığı görülmüştür (4.61, 5.60, 5.92 GPa).

Eklenen iyonların etkisinin yanı sıra, mikro-sertlik üzerinde rölatif yoğunluk ve tane boyutu gibi diğer faktörlerinin de etkisinin olabileceği düşünülmüştür. En çok etkileyen faktörün rölatif yoğunluk yani gözeneklilik miktarı olduğu görünmektedir. Çünkü en düşük gözenekliliğe sahip olan $1300^{\circ}C$ 'de sinterlenen HA'ların mikro-sertlik değerlerinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir. $1300^{\circ}C$ 'de sinterlenen HA'ların gözeneklilik miktarları eklenen iyon miktarlarının artması ile pek fazla bir değişiklik göstermektedir. Fakat diğer sıcaklıklarda HA'larda eklenen iyon miktarı arttıkça rölatif yoğunlukların da artış gözeneklilik miktarının düştüğü görülmektedir. Ayrıca SEM fotoğraflarından da gözlemlenebileceği gibi $1300^{\circ}C$ sinterlenen HA'ların tane boyutlarının iyon etkisine bakılmaksızın birdenbire büyük bir artışa geçtiği görülmektedir. $1300^{\circ}C$ 'de sinterlenen HA'larda Y^{3+} miktarı arttıkça, tane boyutlarının ufaldığı görülmektedir (bknz. Tablo 4.6). Örneğin, $1300^{\circ}C$ 'de sinterlenmiş saf HA'nın tane boyutu 3487 nm olmasına rağmen, 7.5YFHA'nın tane boyutu ise 1641 nm'dir. Yüksek yoğunluklara ek olarak tane boyutlarında, mikro-sertlik değerlerinin artmasına neden olabileceği öngörülmektedir.

4.7. Kırılma Tokluğu

Mikro-sertlik testi sonucunda oluşan hasarın köşegenlerinden oluşan çatlakların uzunluklarının ölçümü ile hesaplanan malzemelerin kırılma toklukları Şekil 4.22 sunulmuştur. Bu şekilde saf ve iyon eklenmiş HA'ların kırılma tokluklarının sinterleme sıcaklıklarına göre değişimleri gösterilmiştir.

HA'ların farklı sinterleme sıcaklıklarından sonra ve eklenen itriyum ve flor elementleri miktarlarında yapılan ölçümler sonunda elde edilen kırılma toklukları 0.98–2.09 $MPa \cdot m^{1/2}$ arasındadır. En yüksek kırılma tokluğuna sahip malzeme 2.09 $MPa \cdot m^{1/2}$ kırılma tokluğu ile $1100^{\circ}C$ 'de sinterlenen 2.5YFHA'dır. En düşük değere (0.98 $MPa \cdot m^{1/2}$) sahip olan malzeme ise $900^{\circ}C$ 'de sinterlenen 5YFHA'dır.



Şekil 4.22. Saf HA ve Y³⁺ ve F eklenmiş HA'ların, 900°C, 1100°C, ve 1300°C'lerde 1 saat sinterlenmelerine bağlı olarak gösterdikleri kırılma tokluğu değişimleri.

Bu çalışmada elde edilen HA'ların kırılma toklukları daha önce yapılan çalışmalara nazaran daha yüksek bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalarda bu değerler 0.96–1.45 MPa.m^{1/2} arasında değişmektedir [92, 93, 96]. Kırılma tokluğu grafiği mikro-sertlik grafiği ile karşılaştırıldığında görülmektedir ki; diğerlerine göre mikro-sertliği yüksek olan malzemelerin kırılma toklukları düşüktür.

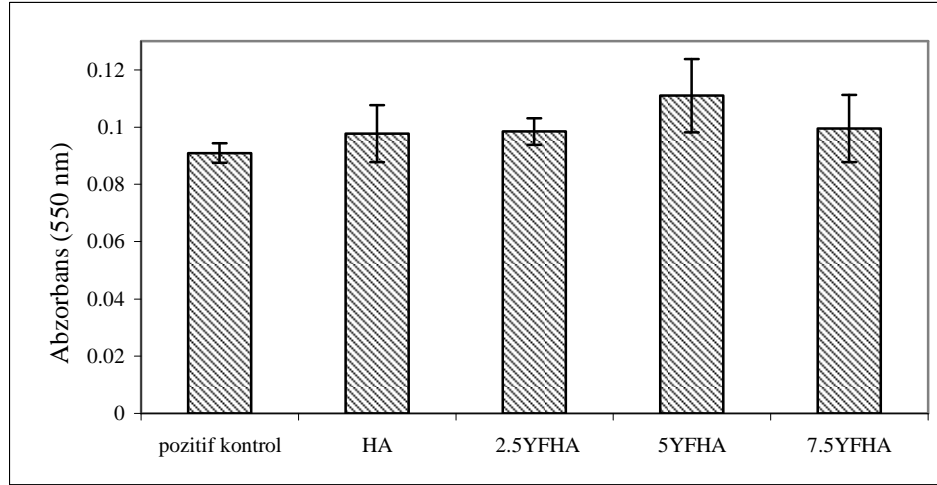
Sinterleme sıcaklığı arttıkça saf HA'ların kırılma toklukları çok fazla miktarlarda artan tane boyutları ve yoğunluğunun diğer malzemelerden daha az olmasından dolayı azalmaktadır. Fakat itriyum ve flor elementleri eklendikçe 900°C ve 1100°C'de sinterlenen HA'ların kırılma toklukları sıcaklık artışı ile artmaktadır. Saf HA'lardaki sıcaklık artışları ile beraber gelen kırılma tokluklarındaki düşmeler eklenen iyonlar sayesinde belli bir yere kadar önlenebilmektedir. Fakat 1300°C gibi çok yüksek sinterleme sıcaklıklarında kırılma tokluklarındaki düşüş devam etmektedir. Bu düşüşlerin nedeni ise muhtemelen tane boyutlarındaki büyük artışlardan ileri gelmektedir.

4.8. İn Vitro Biyouyumluluk Testleri

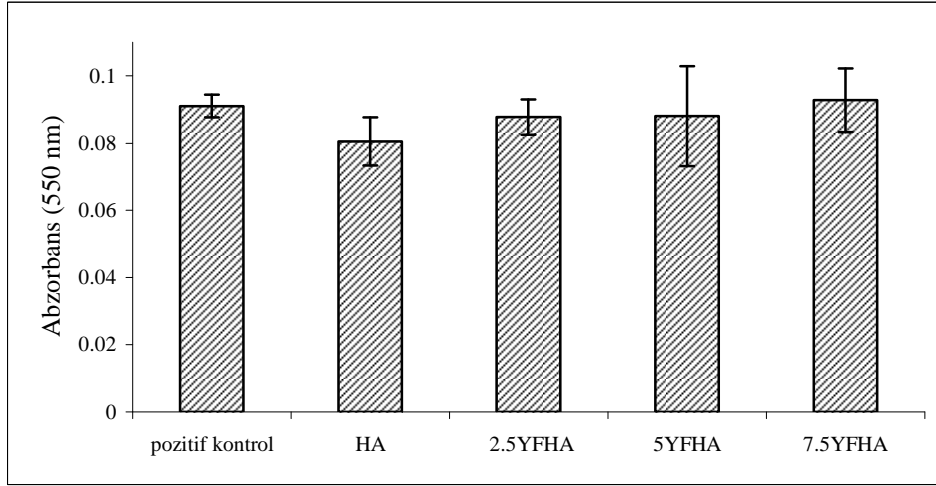
4.8.1. HA ve İyonla Zenginleştirilmiş HA Disk Ekstraktlarında İn Vitro Sitoksisite Çalışmaları

4.8.1.1. MTT Canlılık Testleri

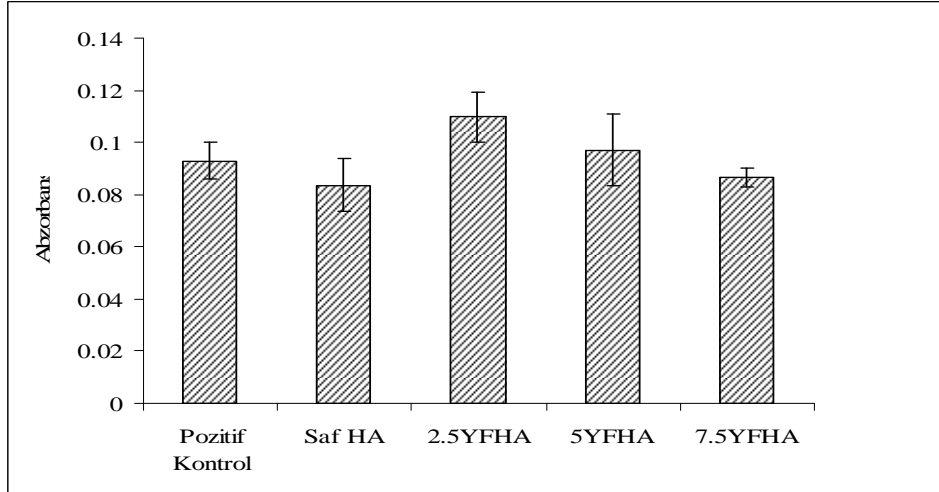
Diskler üzerine ekilen hücrelerin iki günlük inkübasyon sonunda canlılıkları MTT testi ile ölçülmüştür (Şekiller 4.23-4.25). Çeşitli kompozisyonlardaki gruplar arasında ve kontrollerle olan farklılıklar, bağımsız değişkenler arasında tek yönlü ANOVA testi ile ve test sonrası Tukey-ikili karşılaştırma testi ile SPSS programı ile $p \leq 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir. Herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Tüm saf ve iyon eklenmiş disklerin biyouyumlu olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.23. 900°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin 2 günlük inkübasyon sonucunda hücre canlılığı üzerindeki etkisi.



Şekil 4.24. 1100°C'de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin 2 günlük inkübasyon sonucunda hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

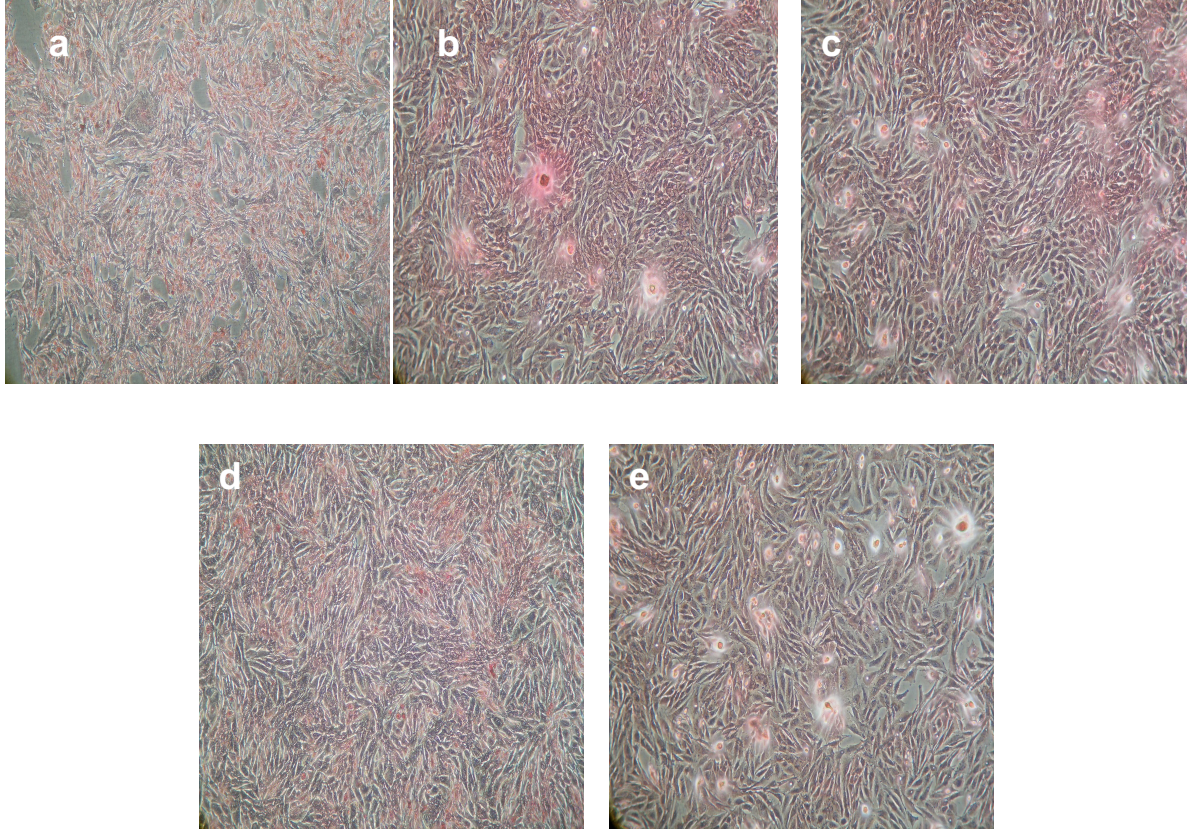


Şekil 4.25. 1300°C'de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin 2 günlük inkübasyon sonucunda hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

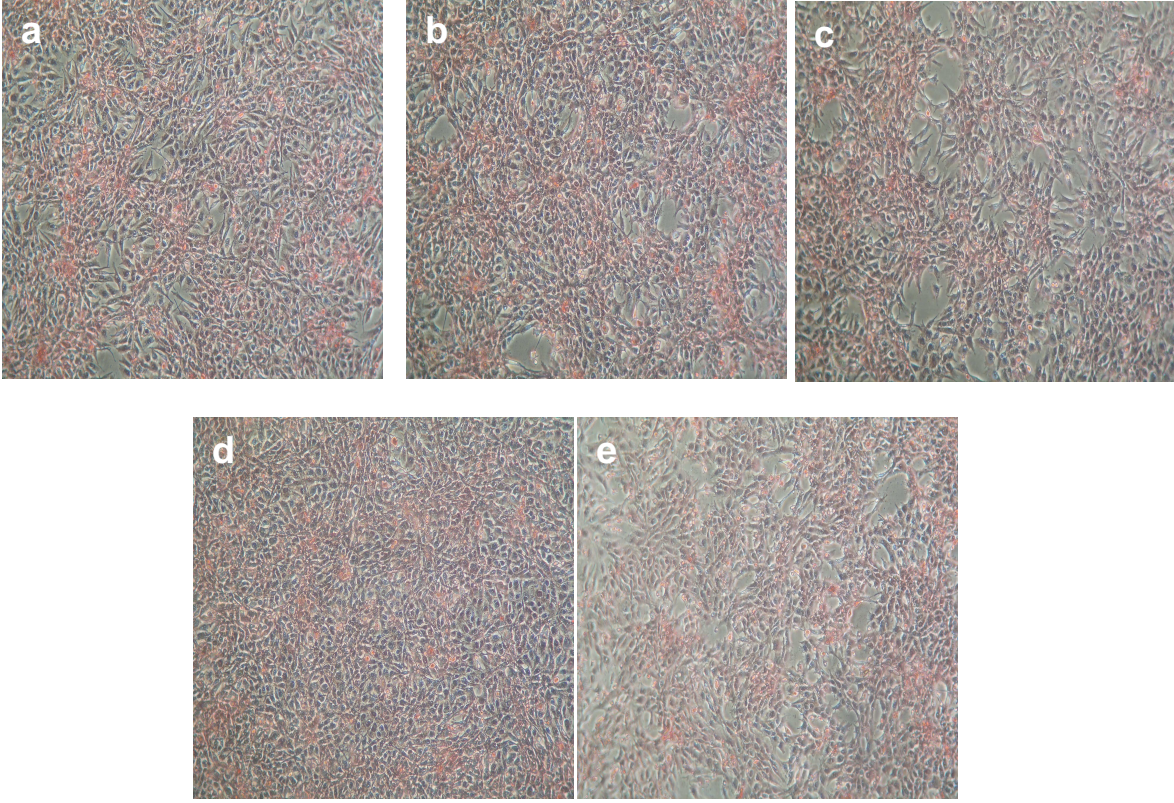
4.8.1.2. Histolojik Boyamalar

12 kuyucuklu plakalara ekilerek 2 gün boyunca ekstrakt vasatında inkübe edilen hücreler, Sirius kırmızısı ile boyanmış ve hücrelerin salgıladıkları kollajen incelenmiştir. Kırmızı boyalı bölgeler kollajen varlığını göstermektedir. Elde edilen görüntüler 4.26- 4.28. şekillerde görülmektedir. Tüm disk ekstratlar için yapılan kollajen boyamalarında Saos-2 hücrelerinin kemik yönüne farklılaşarak kollajen sentezleyerek hücre dışı matriks olarak salgıladıkları gözlenmiştir. 900°C'de sinterlenmiş HA VE 2.5YFHA gruplarında kollajen

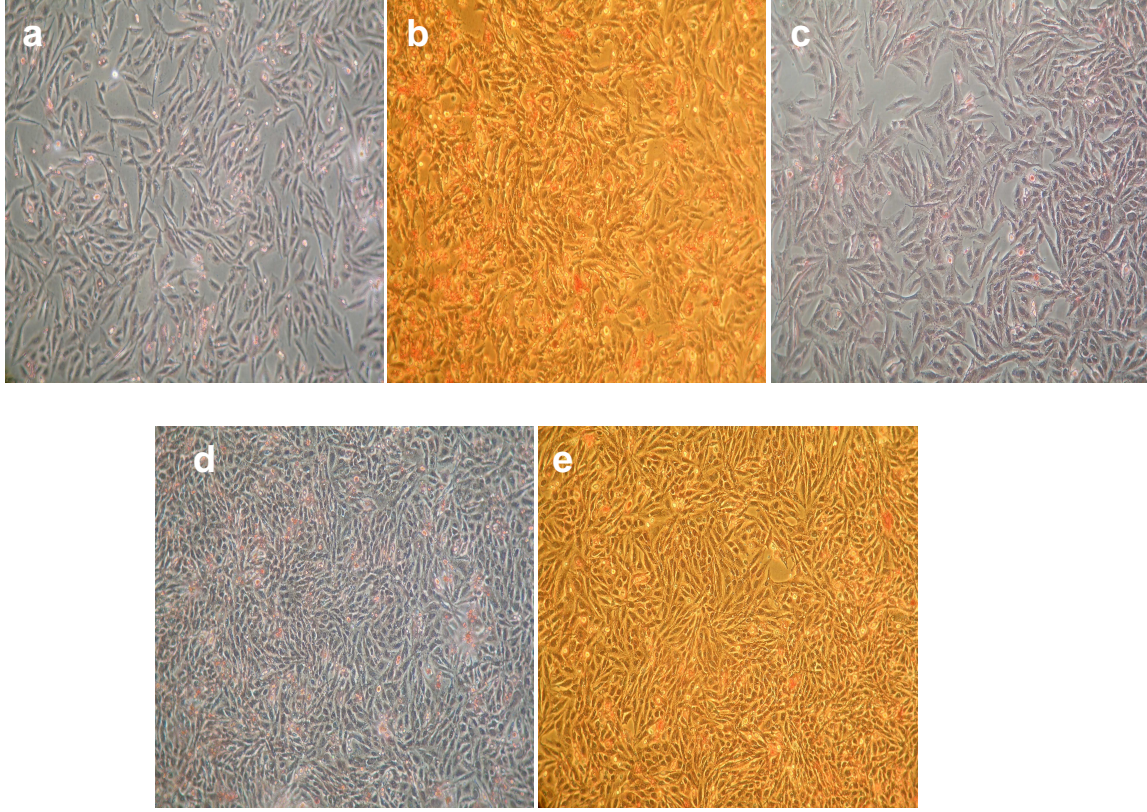
boyamasının pozitif kontrole göre daha fazla boyandığı görülmüştür. Hücre kültür ortamına salınan iyonların hücreler üzerinde pozitif etkis olduğu düşünülmektedir. Diğer sinterleme sıcaklıklarında gruplararası kollajen boyamaları arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Hücrelerin farklılaşma özelliklerinin korunmaları hazırlanan disklerinin diğer canlılık test sonuçları gibi biyouyumlu olduklarını göstermektedir.



Şekil 4.26. 900°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kùltive edilen hücrelerin kollajen boyama faz kontrast ışık mikroskopisi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA.

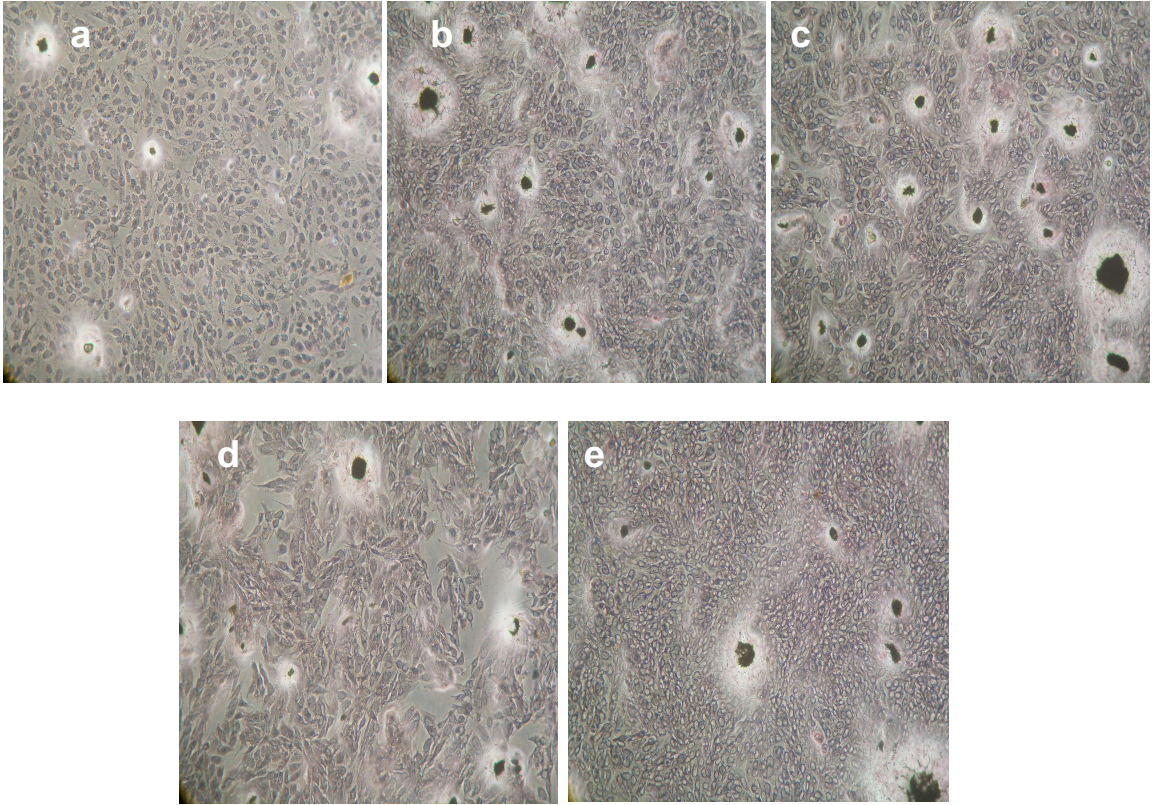


Şekil 4.27. 1100°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin kollajen boyama faz kontrast ışık mikroskopisi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA.

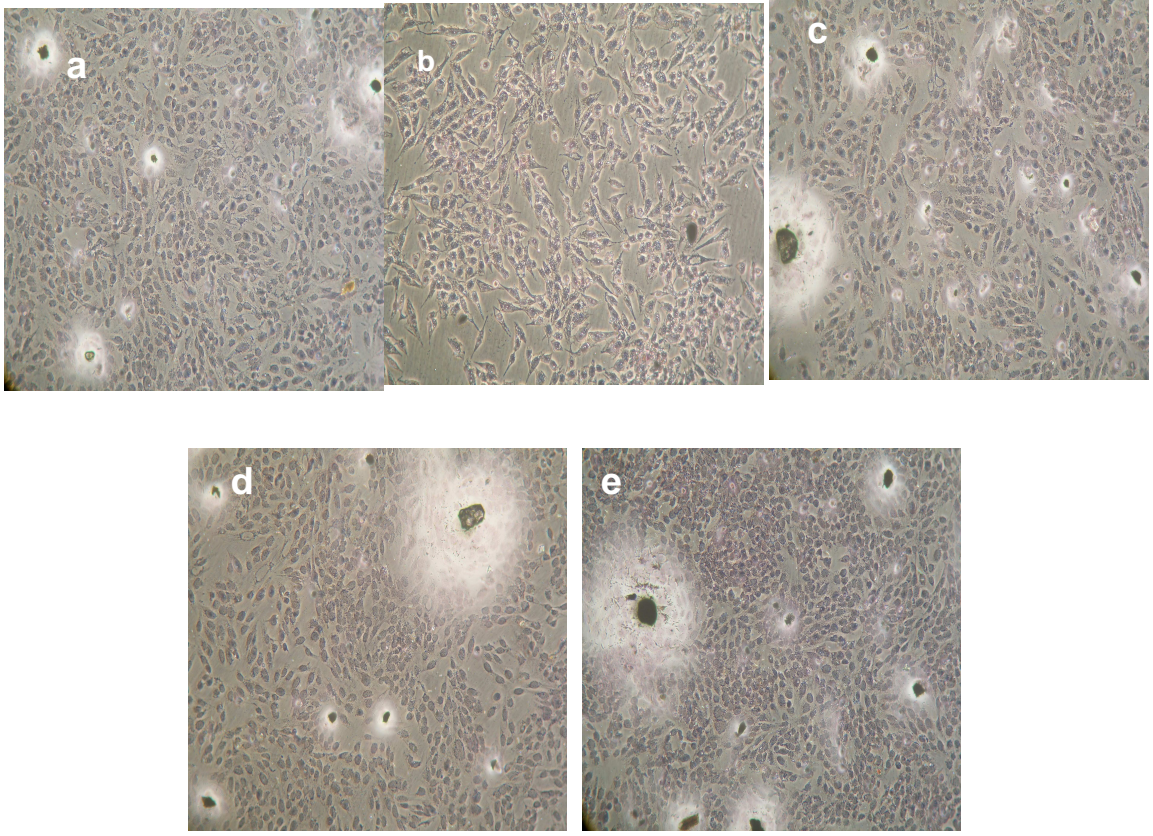


Şekil 4.28. 1300°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin kollajen boyama faz kontrast ışık mikroskopisi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA.

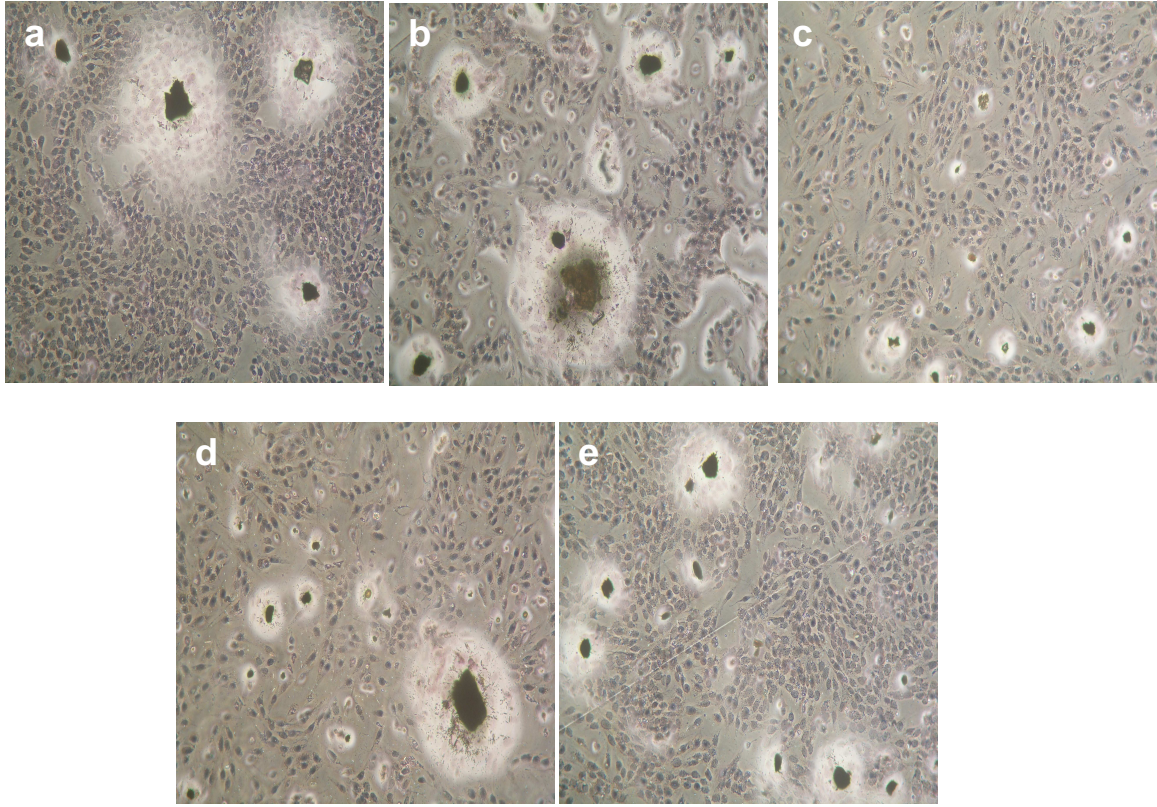
12 kuyucuklu plakalara ekilerek 2 gün boyunca ekstrakt ile inkübe edilen hücreler, % 2’lik Alizarin Kırmızısı ile boyanarak hücrelerde kalsiyum varlığı incelenmiştir. Elde edilen görüntüler 4.29.-4.31. şekillerde görülmektedir. Hücreler mavi renklerde boyanmıştır. Saf HA ve iyon eklenmiş HA’lerin hücrelerin kalsiyum üretme üzerindeki etkileri pozitif kontrolden bir farklılık gözlenmemiştir. Hücreler farklılaşma vasatı içinde kemik yönüne farklılaşmış ve kalsiyum üretmektedir. HA’e flor ve itriyum eklenmesi hücreler üzerinde kalsiyum üretimi açısından bir artışa sebep olmamıştır. Ancak sitotoksite deneylerinde hücreler ekstratlarla sadece 48 saat inkübe edilmiştir. Daha uzun bir süreçteki etkisi diskler üzerine ekilen hücrelerde ALP ve disklerle kültive edilen hücrelerde immnuohistokimyasal yöntemleri ile incelenmiştir (Bkz. Şekiller 4.40-4.48).



Şekil 4.29. 900°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kùltive edilen hücrelerin kalsiyum boyama faz kontrast ışık mikroskobisi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA.



Şekil 4.30. 1100°C’de sinterlenen çeşitli kompozisyonlardaki hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin kalsiyum boyama faz kontrast ışık mikroskopi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA.

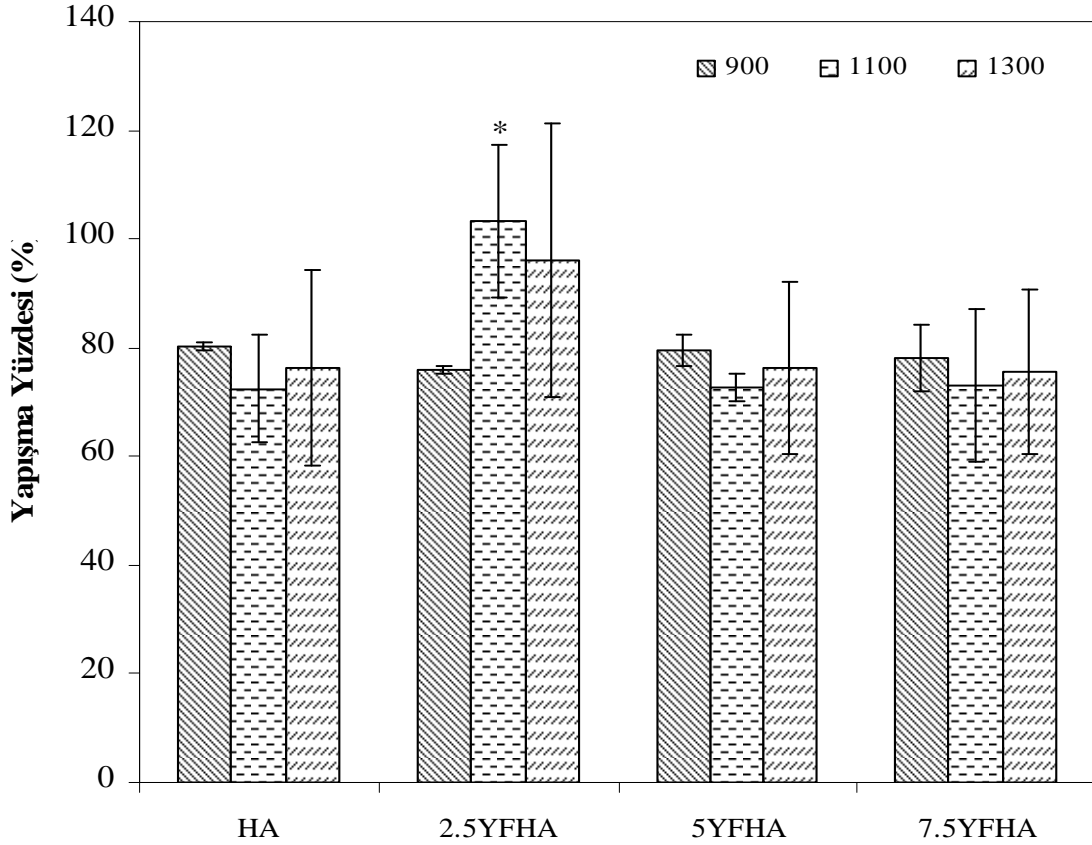


Şekil 4.31. 1300°C’de sinterlenen çeşitli kompozisyonlardaki hidroksiapatit diskleriyle hazırlanan ekstraktlarda kültive edilen hücrelerin boyama faz kontrast ışık mikroskopi görüntüleri: a) pozitif kontrol, b) saf - HA, c) 2.5YFHA, d) 5YFHA, e) 7.5YFHA.

4.8.2. Saf ve İyon Eklenmiş HA Disklerinde Hücre Yapışması ve Çoğalması

Saf ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyon sonunda Saos-2 hücrelerinin yapışma oranları Şekil 4.32’de gösterilmiştir. Tüm diskler üzerindeki hücre yapışma verimliliği, sadece 1300°C’de sinterlenen saf HA hariç, % 70’in üzerindedir. Hücrelerin diskler üzerindeki yüksek yapışma oranı hem saf HA disklerinin hem de iyon eklenmiş HA disklerinin yüzey özellikleri Saos-2 hücrelerinin yapışabilmesi için uygun olduğunu göstermektedir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği üzere flor miktarı belli bir seviyeye ulaşıncı hücrelerin yapışması ve proliferasyonuna pozitif katkı sağlamaktadır [97-99]. Tüm diskler arasında ise en yüksek hücre yapışma oranı (103 ± 14) 1100°C’de sinterlenen 2.5YFHA’da gözlemlenmiştir. Ayrıca, tüm gruplar için, aynı sıcaklıkta sinterlenen iyon eklenmiş HA diskleri üzerindeki hücre yapışması saf HA’lar üzerindeki daha fazladır. HA’ya itriyum ve diğer iyonlar eklenerek yapılan önceki çalışmalarda da itriyum

miktarı hücre yapışması ve çoğalmasını pozitif etkilediği gösterilmiştir. Diğer iyonlarla karşılaştırılmalı yapılan bir çalışmada itriyum iyonlarının diğer iyonlar arasında HA üzerindeki en yüksek hücre yapışmasını sağlamış ve itriyum miktarı arttırıldıkça osteoblast yapışması da artmıştır [100].

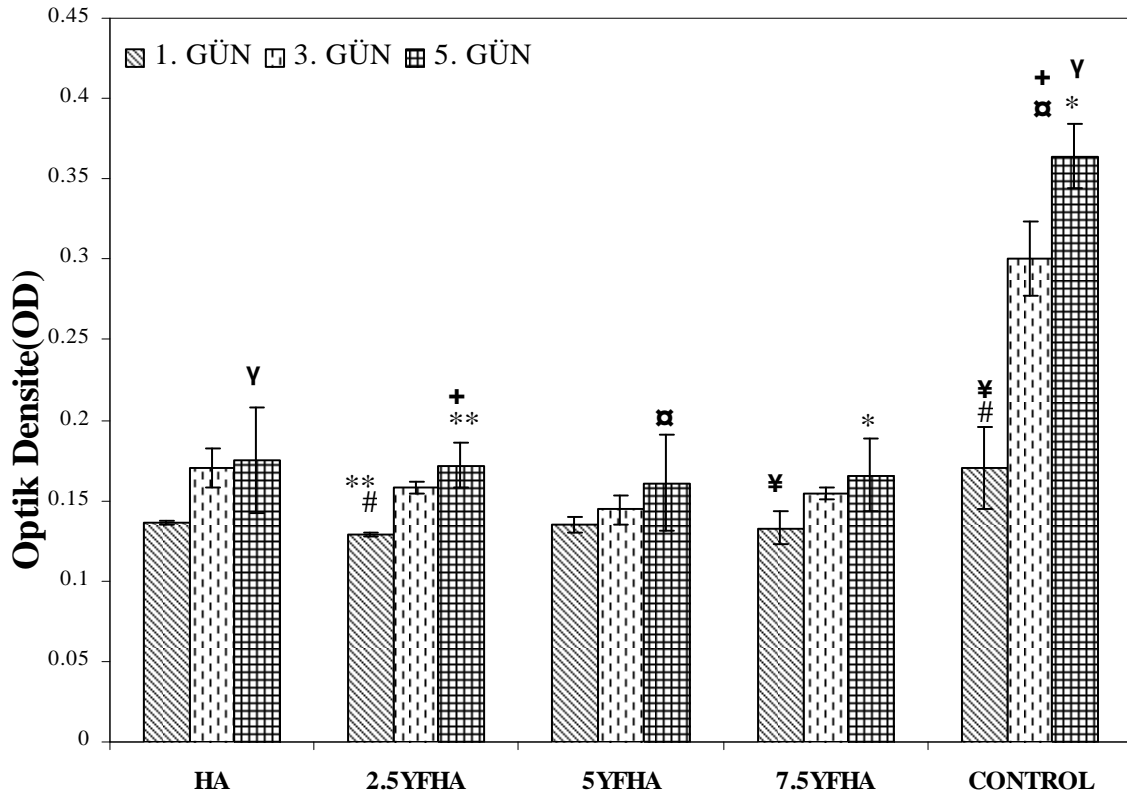


Şekil 4.32. 900°C, 1100°C ve 1300°C’de sinterlenmiş saf ve iyon eklenmiş HA diskler üzerinde 24 saat inkübe edilmiş hücrelerin yapışma yüzdeleri (yapışma yüzdeleri TCPS’ler üzerine yapışan hücreler referans alınarak hesaplanmıştır).

Farklı bir çalışmada 4 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek hücre yapışmasının 5 wt % Y^{3+} ve In^{3+} eklenmiş HA’larda gözlemlendiği belirtilmiştir [101]. İtiryum miktarının mol oranının %2’den az olduğu titanyum substrat üzerine itriyum eklenmiş nano kristalli HA kaplaması üstündeki osteoblast yapışmasının iyileştirilmediği gözlenmiştir [102]. Bu da göstermektedir ki hücre yapışmasının arttırılabilmesi için itriyum miktarının belli bir seviye üzerinde olması gerekmektedir. Bu çalışmada ise flor iyonuna ek olarak % 2.5 itriyum eklenmiş HA disklerinin üzerinde tüm sinterleme sıcaklıklarında saf ve diğer oranlarda iyon eklenmiş HA’lar ile karşılaştırıldığında en yüksek hücre yapışması gözlemlenmiştir (Şekil

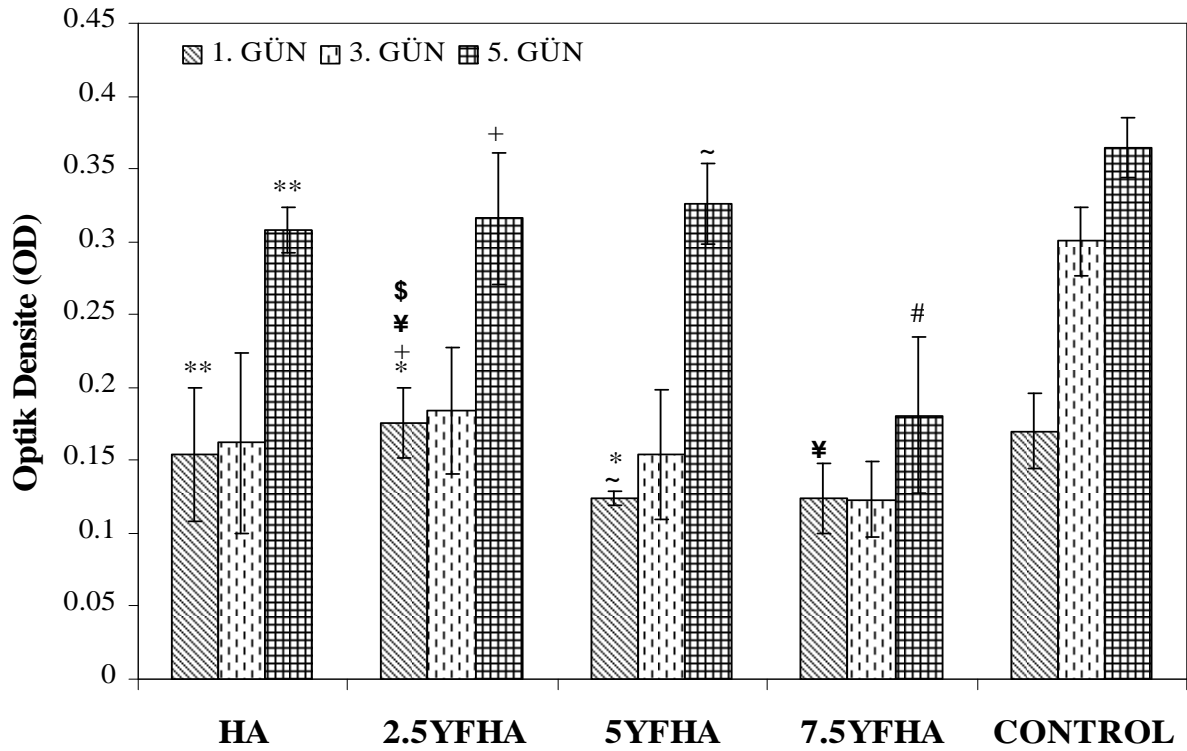
4.32). Ayrıca, en yüksek sinterleme sıcaklıklarında ve mikron boyutlu taneciklere sahip disklerde bile itriyum oranı az olanlarda hücre yapışması % 80 üzerindedir. Literatürde yüzey özelliklerinin ve tane boyutlarının da hücre yapışmasında etkileri olduğu belirtilmektedir. Önceki çalışmalarda küçük tane boyutuna sahip malzemeler üzerindeki yapışma daha fazladır [103-105]. Bu çalışmada da hücre yapışması 1300°C sinterlenmiş mikron boyutta tanelere sahip saf HA diskleri üzerinde en düşüktür. Bunun nedeninin de itriyum ve flor iyonlarının eklenmesi olduğu düşünülmektedir.

Şekil 4.33’de 900°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerinde 1, 3 ve 5 gün boyunca inkübe edilmiş ve Saos-2 hücrelerinin çoğalması MTT canlılık testi ile incelenmiştir. Bu sıcaklıkta sinterlenen diskler üzerinde hücre çoğalması pek fazla bir farklılık göstermemiştir. Kontrol yüzeyinde hücre çoğalmasının tüm HA diskleri üzerindeki daha fazla olduğu görülmüştür. Bu farklılığın yüzey özelliklerinden (yüzey pürüzlüğü, hidrofilitesi, kimyasal kompozisyonu, vb.) kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. MTT sonuçları 1 ve 5 günlük inkübasyonlar sonunda karşılaştırıldığında belirgin bir farkın sadece 2.5YFHA’nın sonuçları arasında olduğu görülmüştür.



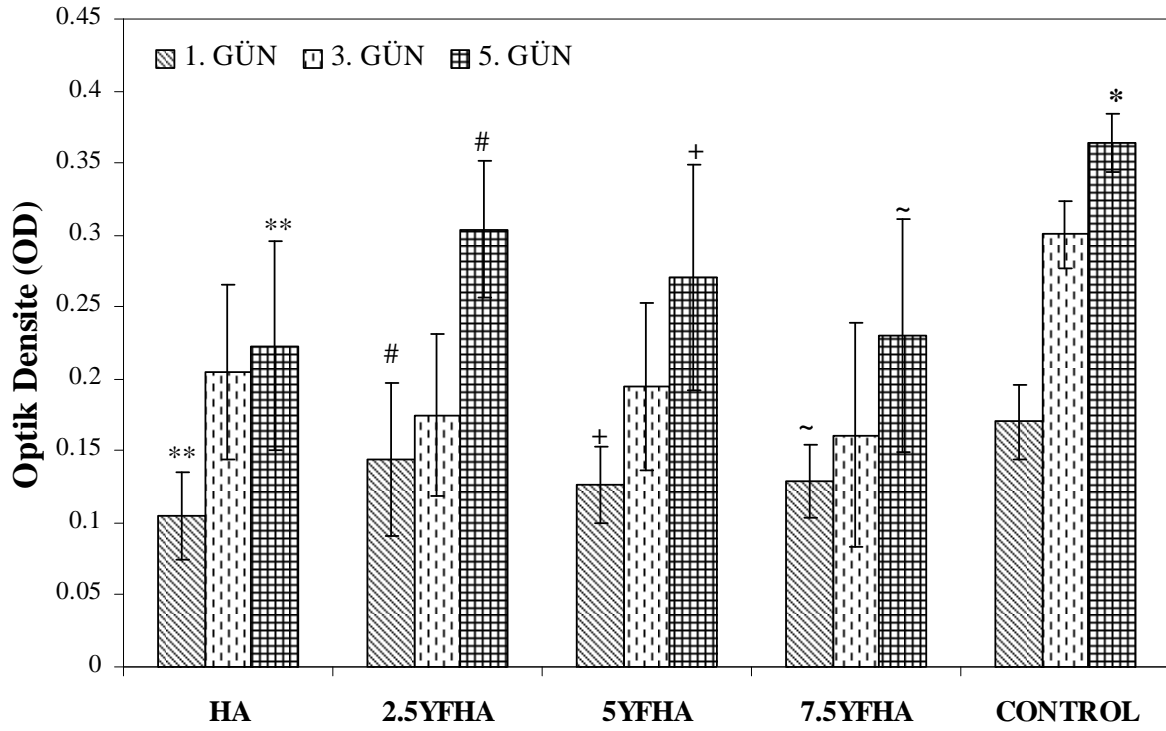
Şekil 4.33. 900°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücre çoğalması; TCPS üzerine ekilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır (*, **, ¥, γ, α, + işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, p<0.05).

Şekil 4.34’de Saos-2 hücrelerinin 1100°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerinde 5 günlük inkübasyonunda çoğalmaları verilmektedir. Bu grupta 1. ve 3. günler sonunda diskler arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. 5 günlük inkübasyon sonunda ise 7.5YFHA diskleri üzerindeki hücre çoğalmasının istatistiksel olarak diğer tüm saf ve iyon eklenmiş HA’lar üzerindeki daha düşük seviyede olduğu görülmüştür. 5 günlük süre sonunda saf HA, 2.5YFHA ve 5YFHA disklerinin MTT sonuçları arasında belirgin bir fark çıkmamıştır. Ayrıca HA, 2.5YFHA ve 5YFHA disklerindeki hücre çoğalması kontrol grubu ile karşılaştırılabilecek düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada flor miktarı sürekli sabit (% 2.5 mol) tutulurken itriyum oranı 2.5–7.5 arasında değişmektedir. Saf HA’ya nazaran % 2.5 ve 5 mol itriyum eklenmiş HA’larda hücre çoğalması daha hızlıdır. Önceki çalışmalarda belirtildiği gibi hücre yapışmasını arttırmak için eklenen malzemelerin minimum bir değerde olması gerekmektedir [100, 102]. Bu çalışmada da görülmektedir ki hücre aktivitelerinin devam edip çoğalmasının sürebilmesi için de itriyum oranının % 5 olması gerekmektedir. Bu seviyenin üzerinde eklenen malzemeler de hücre proliferasyonunu negatif yönde etkileyebilmektedir. % 7.5 itriyum eklenmiş HA disklerinde gözlemlenen daha düşük seviyedeki çoğalmasının da bu sınırın aşılmış olmasında kaynaklı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.34. 1100°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücre çoğalmaları, TCPS üzerine ekilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır (*, **, ¥, γ, α, + işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, p<0.05).

Şekil 4.35 1300°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerinde 5 gün boyunca inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin çoğalmasının için yapılan MTT abzorbans değerlerini vermektedir. 1. ve 5. gün MTT sonuçları karşılaştırıldığında tüm gruplar için belirgin farklar gözlemlenmiştir. 2.5YFHA ve 5YFHA üzerindeki hücrelerin çoğalma seviyesi sayısal olarak kontrol grubundakinden düşük olmasına rağmen yine de bu grubun çoğalma seviyesine yakın çıkmıştır. Şekil 35’de de görüldüğü gibi diskler üzerindeki hücre yoğunlukları inkübasyon zamanı arttıkça artmaktadır. 5 günlük inkübasyon sonucunda tüm saf ve iyon eklenmiş HA diskler arasında en yüksek çoğalma seviyesi 2.5YFHA diskleri üzerinde görülmüştür.

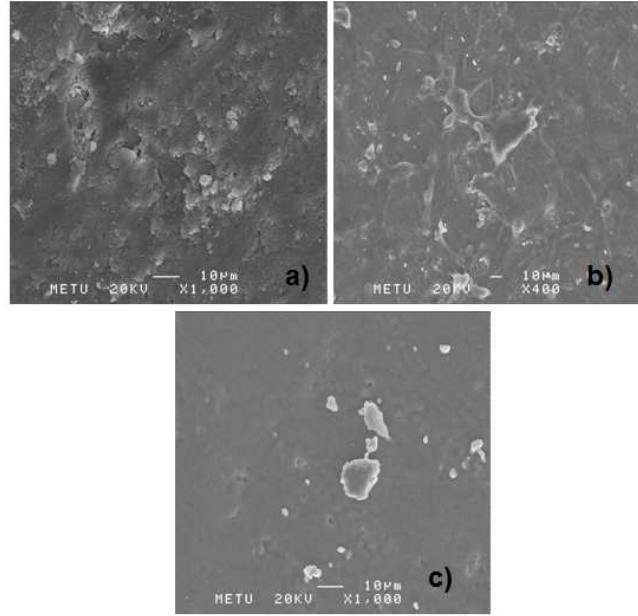


Şekil 4.35. 1300°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücre çoğalmaları; TCPS üzerine ekilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır (*, **, ~, +, #, işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, $p < 0.05$).

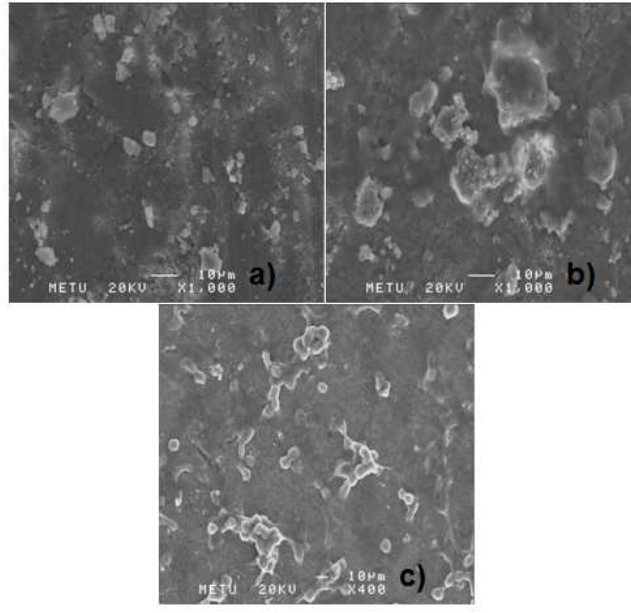
Sinterleme sıcaklıkları da flor ve itriyum eklenmiş HA’lardaki hücre çoğalmalarında etkili olmuştur. Mesela 5inci gün sonunda en düşük MTT sonuçları tüm HA’lar içinde 900°C’de sinterlenmiş HA’lar için elde edilmiştir. 1100°C ve 1300°C’de sinterlenmiş HA disklerinin üzerlerindeki çoğalma oranları birbirlerine benzerdir. Hücreler diskler üzerine yapıştıktan sonra en hızlı çoğalma 1100°C ve 1300°C’de sinterlenen HA’larda görülmüştür. Tüm kompozisyonlarda ve sıcaklık grupları arasında 1. ve 5. günler sonunda en yüksek MTT sonuçları 2.5YFHA disklerinden elde edilmiştir. Genel olarak bakıldığında 1100°C ve 1300°C’de sinterlenen HA’larda itriyum oranı % 2.5’tan % 7.5 mol oranına çıktığında hücre çoğalması azalmıştır. Aslında bu sonuçlar önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla çelişmektedir [100]. Fakat diğer çalışmaların aksine burada itriyum HA’ya eklenen tek iyon değildir. Flor ve itriyum aynı anda eklenerek HA’lar hazırlanmıştır. Bu yüzden çıkabilecek çelişkiler bu farktan kaynaklı olabilir.

4.8.3. Saf ve İyon Eklenmiş HA Diskler Üzerine Ekilen Hücre Morfolojileri

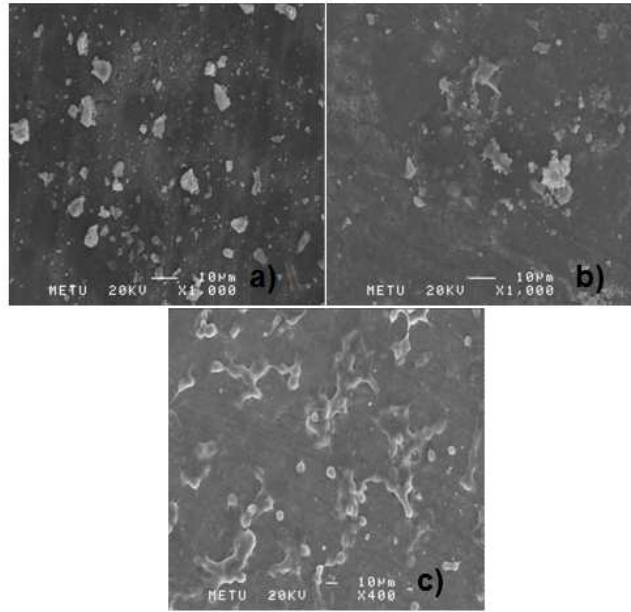
4.36.-4.39. şekillerde görüldüğü gibi farklı sıcaklıklarda sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA'lar üzerindeki Saos-2 hücrelerinin yüzeylere yapıştığı ve yüzeylerde büyümüştür. SEM mikrograflar MTT sonuçları ile de uyuşmaktadır. 5inci günde diskler üzerindeki hücreler o kadar iyi yayılmışlardır ki alt yüzeyden hücreleri ayırt etmek güçleşmiştir. MTT sonuçlarına (Şekil 4.33-4.35) paralel olarak en iyi görüntüler 1100°C (Şekil 4.37b) ve 1300°C'de (Şekil 4.37c) sinterlenmiş 2.5YFHA disklerinden elde edilmiştir.



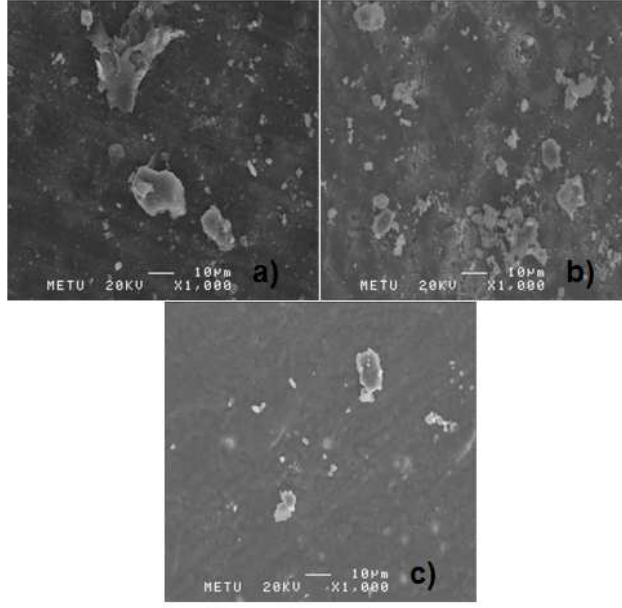
Şekil 4.36. Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş HA diskler üzerinde 5 günlük inkubasyon sonunda Saos-2 hücrelerinin taramalı electron mikroskopi görüntüleri: a) 900°C, b) 1100°C, c) 1300°C.



Şekil 4.37. Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş 2.5YFHA diskler üzerinde 5 günlük inkubasyon sonunda Saos-2 hücrelerinin taramalı electron mikroskopi görüntüleri: a) 900°C, b) 1100°C, c) 1300°C.



Şekil 4.38. Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş 5YFHA diskler üzerinde 5 günlük inkubasyon sonunda Saos-2 hücrelerinin taramalı electron mikroskopi görüntüleri: a) 900°C, b) 1100°C, c) 1300°C.

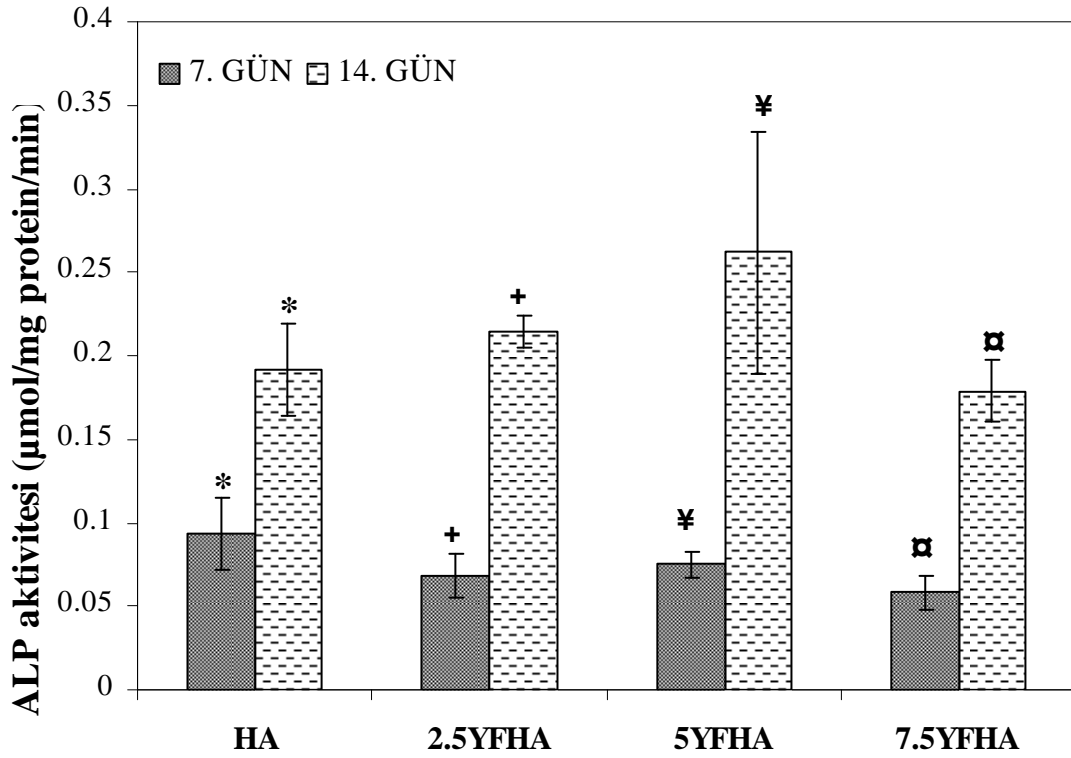


Şekil 4.39. Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş 7.5YFHA diskler üzerinde 5 günlük inkübasyon sonunda Saos-2 hücrelerinin taramalı electron mikroskopi görüntüleri: a) 900 °C, b) 1100°C, c) 1300°C.

4.8.4. ALP Aktiviteleri

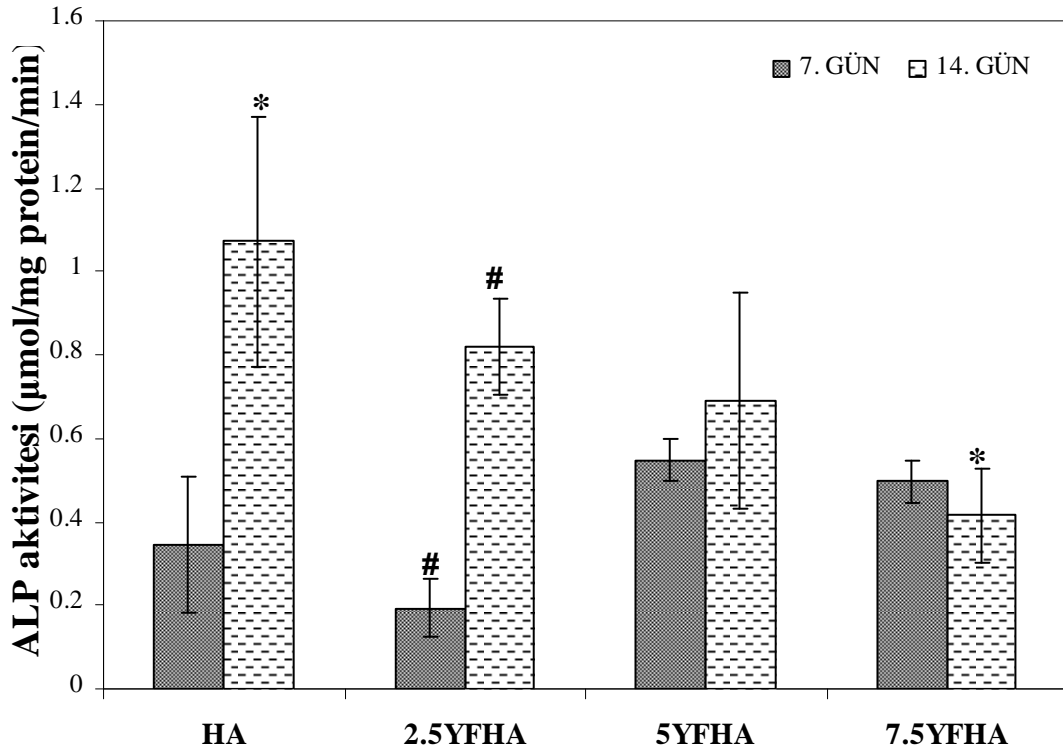
Saos–2 hücreleri saf ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerine ekilerek bu disklerin osteojenik vasat içerisinde 14 gün inkübe edilmiştir. Böylelikle hücrelerin osteoblastik farklılaşma durumları gözlemlenmiştir. Farklılaşmanın işaretleri olarak hücrelerin ALP aktiviteleri belirlenmiştir. Şekil 4.40’da 900°C, 1100°C ve 1300°C sinterlenmiş saf ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerinde gelişen hücrelerin ALP aktiviteleri iki farklı inkübasyon süresi boyunca (7 ve 14 gün) gösterilmiştir.

Şekil 4.40’da görüldüğü gibi Saos–2 hücrelerinin ALP aktiviteleri zamana bağlı olarak artmıştır. Bu da itriyum ve flor iyonlarının eklenmesinin hücrelerin farklılaşmasını sağladığını göstermektedir. İyon eklenmiş HA diskleri üzerinde oluşan ALP miktarı sayısal olarak saf HA üzerindeki fazladır fakat istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. İki inkübasyon zamanı sonunda da tüm gruplardaki ALP miktarları benzerdir.



Şekil 4.40. 900°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücrelerin 7 ve 14 günlük inkübasyonlar sonundaki ALP aktiviteleri (*, +, ¥, α işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, $p < 0.05$).

Şekil 4.41’de görüldüğü gibi ALP aktiviteleri zamanla artmaktadır. 7. günde ölçülen saf HA üzerindeki hücrelerinin ALP aktiviteleri 5YFHA ve 7.5YFHA’lardaki aktivitelerden daha düşüktür. Fakat bu farklılık istatistiksel anlamlı bir farklılık değildir. 14. günde ölçülen ALP aktivite değerleri tüm gruplar için de 7. günde ölçülen değerlerden fazla bulunmuştur. Fakat istatistiksel olarak tek fark 2.5YFHA üzerindeki hücreler tarafından üretilen ALP miktarı olmuştur. Eklenen flor ve itriyum iyonlarının ALP miktarlarında istatistikî olarak pek fark yaratmadığı görülmüştür. Sadece 7.5YFHA üzerindeki ALP miktarı 14. günde 7 günlük inkübasyona göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin de artan itriyum miktarının osteojenik farklılaşmayı olumsuz etkilediği olduğu düşünülmektedir.

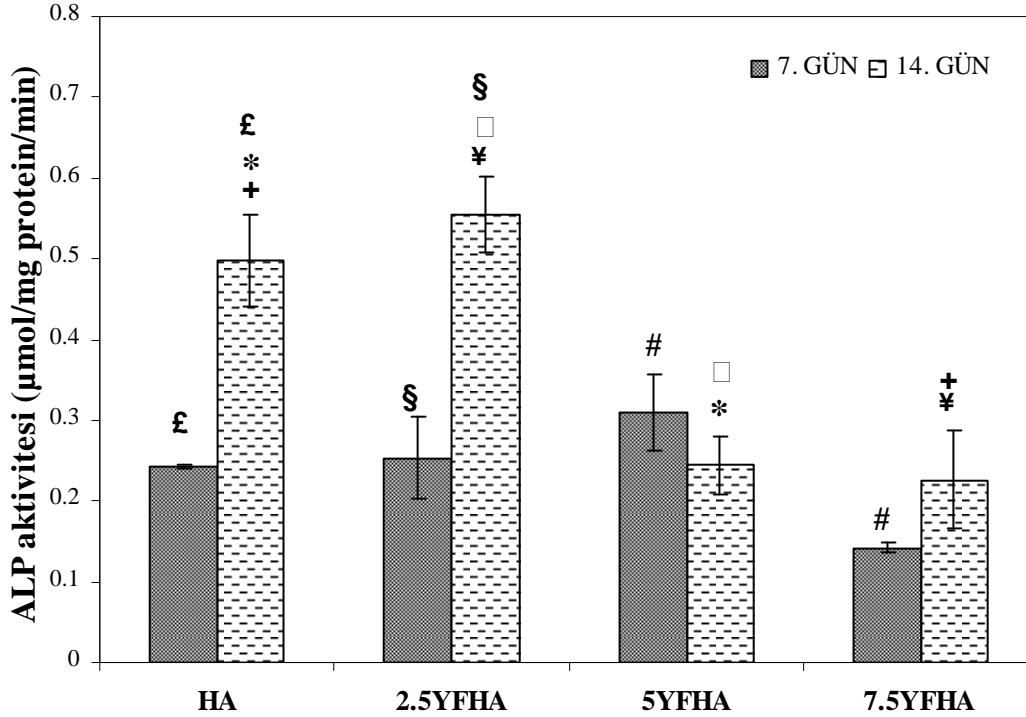


Şekil 4.41. 1100°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücrelerin 7 ve 14 günlük inkübasyonlar sonundaki ALP aktiviteleri (*, # işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, $p<0.05$).

Şekil 4.42’de görüldüğü gibi 7. günlerde ölçülen ALP miktarları birbirlerine benzerdir. Sadece 5YFHA’daki ALP miktarı 7.5YFHA’daki ALP miktarından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Saf HA ve 2.5YFHA’daki hücrelerin ürettiği ALP miktarları zamana bağlı bir artış gösterirken diğer gruplarda bu durum gözlenmemiştir. Fakat istatistiksel olarak gözlemlenen tek fark 7. ve 14. günler arasında 2.5YFHA diskleri üzerindeki hücrelerin ALP miktarları arasında bulunmuştur. Diğer iyon eklenmiş HA’larda istatistikî bir artış yoktur. Fakat 14. günde 7.5YFHA üzerindeki hücrelerin ürettiği ALP miktarları saf HA üzerinde üretilenden istatistiksel olarak daha az bulunmuştur. Bu da yine itriyum miktarının bu kadar çok artmasının Saos-2 hücrelerinin farklılaşmasını olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir.

Ayrıca 1100°C ve 1300°C sinterlenen HA’lara ekilen hücrelerin ürettiği ALP miktarlarının 900°C’de sinterlenmiş disklere ekilen hücreler tarafından sentezlenen miktarlara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Özellikle 1100°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA’larının, 5YFHA hariç, 14üncü günde hesaplanan ALP miktarları diğer tüm gruplarda

gözlenen miktarlardan istatistiksel olarak daha fazla bulunmuştur. 1100°C’de sinterlenmiş 2.5YFHA üzerindeki ALP miktarı tüm sıcaklıklar ve kompozisyonlar arasında gözlenen en yüksek ALP miktarı olduğu gözlemiştir.



Şekil 4.42. 1300°C’de sinterlenen saf ve iyon eklenen HA diskler üzerindeki hücrelerin 7 ve 14 günlük inkübasyonlar sonundaki ALP aktiviteleri (£, \$, +, *, ¥, □, # işaretleri belirgin farklılıkları ifade eder, p<0.05).

Hücrelerin yapışması hücre çoğalmasının olabilmesi için ilk adımdır. Hücreler belli bir yoğunluğa ulaştınca büyüme yavaşlar ve çoğalma başlar. Hücresel tüm süreçler birbirleri ile bağlantılıdır. Bu çalışmada yüksek hücre yapışması gösteren malzemeler üzerindeki ALP üretiminin de fazla olduğu görülmüştür.

Önceki çalışmalar flor iyonunun, hücresel aktivitelere, eklenme miktarına göre etki ettiğini göstermiştir [97, 98, 100, 101, 106, 107]. Düşük konsantrasyonlarda (0.231–0.313 mol F/mol apatit) eklenen flor iyonlarının hücresel aktiviteler üzerinde belirgin bir etkisinin görülmediği söylenmiştir fakat daha yüksek konsantrasyonlarda (0.422–0.567 mol F/mol apatit) ise az miktarda bir artış görülmüştür [98, 99]. Bu çalışmada da flor miktarı tüm iyon eklenmiş HA’lar için 0.26 mol F/mol apatit’tir. Flor iyonu miktarı sabit tutulurken itriyum miktarı değiştirilmiştir. Bu yüzden bu çalışma için eklenen iyonlara göre bir inceleme

yapıldığında ALP aktivitesini asıl etkileyen iyonun flor değil de itriyum olduğunu sonucuna varılabilmektedir.

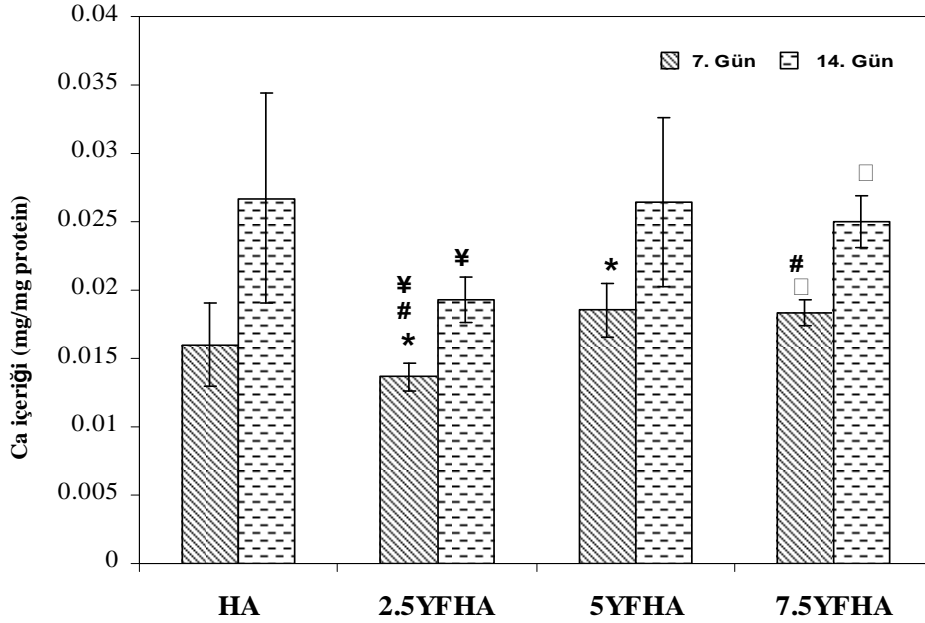
Literatüre baktığımızda itriyum eklenen HA'lar üzerindeki ALP aktiviteleri için farklı yorumlar yapılmaktadır. Bazı çalışmalar itriyum eklenmiş HA ile saf HA arasında ALP aktiviteleri açısından belirgin bir fark gözlenmediğinden hatta 21inci günde düşüşlerin olduğundan bahsederken [102], başka bir çalışma da titanyum substratlı HA kaplı yüzeylerde itriyum iyon eklenmiş olan kaplama üzerindeki ALP miktarını saf HA kaplamalı yüzeydekinden daha fazla olduğunu belirtmiştir [103]. Bu çalışmada ise, literatüre paralel olarak, itriyum oranı düşük malzemelerde ALP miktarının fazla olduğu görülmüştür (Şekiller 1-3). Fakat itriyum miktarı arttıkça ALP aktivitelerinde düşüşler gözlenmiştir. Genel olarak tüm sıcaklıklar için iyon eklenmiş HA'lar üzerinde üretilen ALP miktarı artan itriyum miktarı ile azalmıştır.

4.8.5. Kalsiyum Birikimi Analizleri

Osteoblast hücreleri tarafından gerçekleştirilen kalsiyum birikimi (veya mineralizasyon), sorunlu bölgede ve/veya implant bölgesinde, yeni kemiğin kısa sürede oluşumu için çok önemlidir. Osteoblast hücreleri tarafından gerçekleştirilen kalsiyum birikimi, *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında, osteoblastik farklılaşma tayini için kullanılan göstergelerden biridir. Bu nedenle, eklenen iyonların miktarlarının ve sinterleme sıcaklığının hücrelerin kalsiyum birikimi üzerindeki etkilerini araştırmak için, saf HA ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerindeki hücre dışı kalsiyum miktarları belirlenmiştir. Şekil 1-3 de üç farklı sıcaklıkta sinterlenmiş saf HA ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerine ekilmiş hücreler tarafından gerçekleştirilen kalsiyum birikiminin 7 ve 14 günlük inkübasyon sonunda verdiği sonuçlar gösterilmektedir.

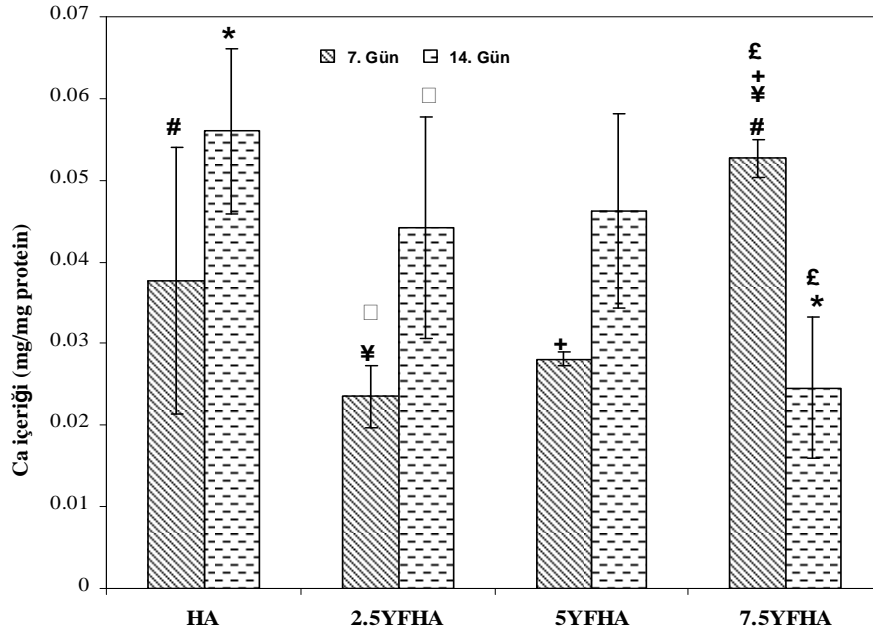
Şekil 4.43, 900°C'de sinterlenmiş, saf ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerindeki hücreler tarafından 7 ve 14 günlük dönemler sonrasında gerçekleştirilen kalsiyum birikimini göstermektedir. Bütün hidroksilapatitler için, hücreler tarafından gerçekleştirilen kalsiyum birikiminde zamana bağlı bir artış gözlemlenmiştir. Sadece 2.5YFHA ve 7.5YFHA disklerinde kalsiyum içeriğinde belirgin bir artış görülmüştür. Saf HA ve 5YFHA disklerinde, zamana bağlı biriken kalsiyum miktarı açısından herhangi bir istatistiksel artış gözlenmemiştir. Şekil 4.43'de görüldüğü gibi, 7 günün sonunda kalsiyum içeriği bütün HA'lar için benzer değerler vermiştir. 14 günün sonunda, saf HA, 5YFHA ve 7.5YFHA malzemeleri hücreler tarafından biriktirilen kalsiyum miktarları açısından benzerlikler göstermiştir. Fakat 2.5YFHA üzerindeki kalsiyum birikimi, iyonlar eklenmiş diğer HA'lere

göre belirgin derecede düşmüştür. HA'ye eklenen itriyum miktarı arttıkça, kalsiyum birikiminde artış gözlemlenmiştir.



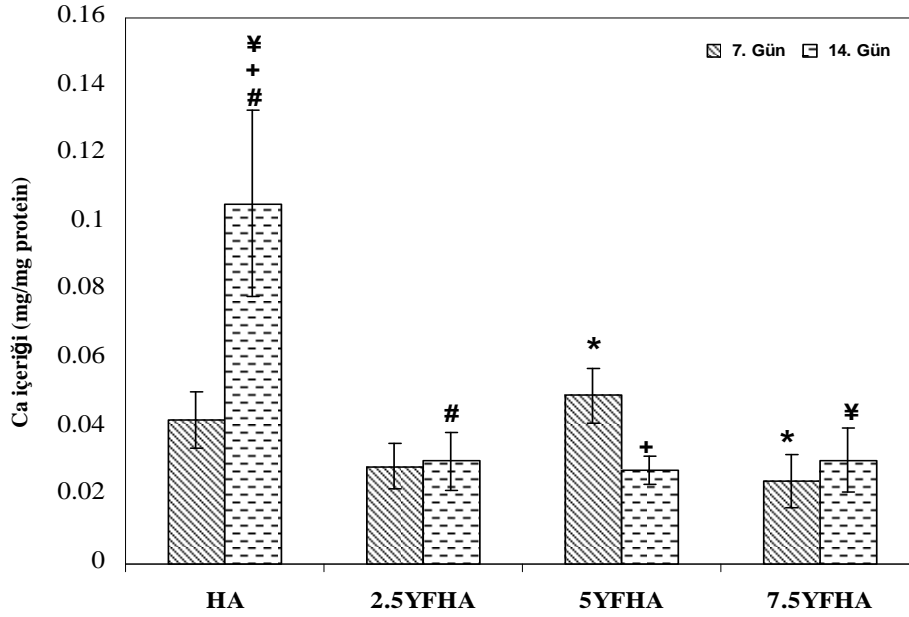
Şekil 4.43. 7 ve 14 günlük inkübasyon sonunda 900 °C'de sinterlenmiş HA disklerinin kalsiyum içeriği (*, #, ¥, □: p<0.05 gruplar arasındaki belirgin farklar).

Şekil 4.44, 1100°C de sinterlenmiş, saf ve iyon eklenmiş HA disklerinin üzerinde 7 ve 14 günlük dönemler sonrasında biriken hücre dışı kalsiyum miktarını göstermektedir. Genel olarak, 7'nci günde 7.5 YFHA dışındaki HA disklerinin üzerinde biriken hücre dışı kalsiyum miktarı istatistiksel olarak benzer sonuçlar vermiştir. 7.5YFHA malzemesinin diğer iyon eklenmiş HA disklerine göre daha çok kalsiyum içerdiği belirlenmiştir. 14 günün sonunda kalsiyum birikiminin 7.5 YFHA dışındaki bütün gruplar için arttığı gözlemlenmiştir. 7.5 YFHA için gözlemlenen bu düşüş hücrelerin mineralizasyon aşamasından sonra gelen geç farklılaşma dönemine geçmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sinterlenme sıcaklıkları incelendiğinde ise, 1100°C de sinterlenen saf ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerindeki kalsiyum birikim miktarının (Şekil 4.44), 900°C de sinterlenmiş aynı kompozisyona sahip disklerden iki kat fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.43). Bu sonuçlar bir önceki rapor döneminde sonuçları verilmiş olan hücrelerin yüksek çoğalma kapasiteleri ve ALP aktiviteleri ile paralellik göstermiştir. Bu bulgular, sinterleme sıcaklığının saf ve iyon eklenmiş HA malzemelerinin yüzey özelliklerini değiştirdiği ve hücrenin biyomalzemeye olan tepkisini etkilediği bulgularını desteklemektedir.



Şekil 4.44. 7 ve 14 günlük inkübasyon sonunda 1100°C’de sinterlenmiş HA disklerinin kalsiyum içeriği (*, #, ¥, +, £: p<0.05 gruplar arasındaki belirgin farklar).

Şekil 4.45, 1300°C de sinterlenmiş, HA disklerinin üzerinde 7 ve 14 günlük dönemler sonrasında biriken hücre dışı kalsiyum miktarını göstermektedir. 7’nci günde saf HA, 2.5YFHA ve 7.5 YFHA malzemelerinin benzer miktarlarda kalsiyum birikimine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Fakat, 7’nci günde 5YFHA üzerindeki kalsiyum miktarında 7.5 YFHA ile karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde artış olduğu görülmektedir. İyon eklenmiş HA diskleri için, kalsiyum miktarlarında zamana bağlı belirgin bir artış gözlemlenmemiştir. Benzer bir düşüş de 5YFHA malzemesi için 14’üncü gündeki kalsiyum miktarı için gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak, 14’üncü günde, saf HA üzerinde biriken kalsiyum miktarı, iyon eklenmiş HA disklerine göre belirgin bir biçimde artmıştır. Bu, Şekil 4.45’de de görüldüğü gibi HA içerisine iyon eklenmesinin, kalsiyum birikiminin azalmasına neden olduğunu göstermektedir. Kalsiyum birikimi, iyon eklenerek 1100°C de sinterlenmiş HA disklerinde, 1300°C’de sinterlenenler ile benzer sonuçlar vermiştir.

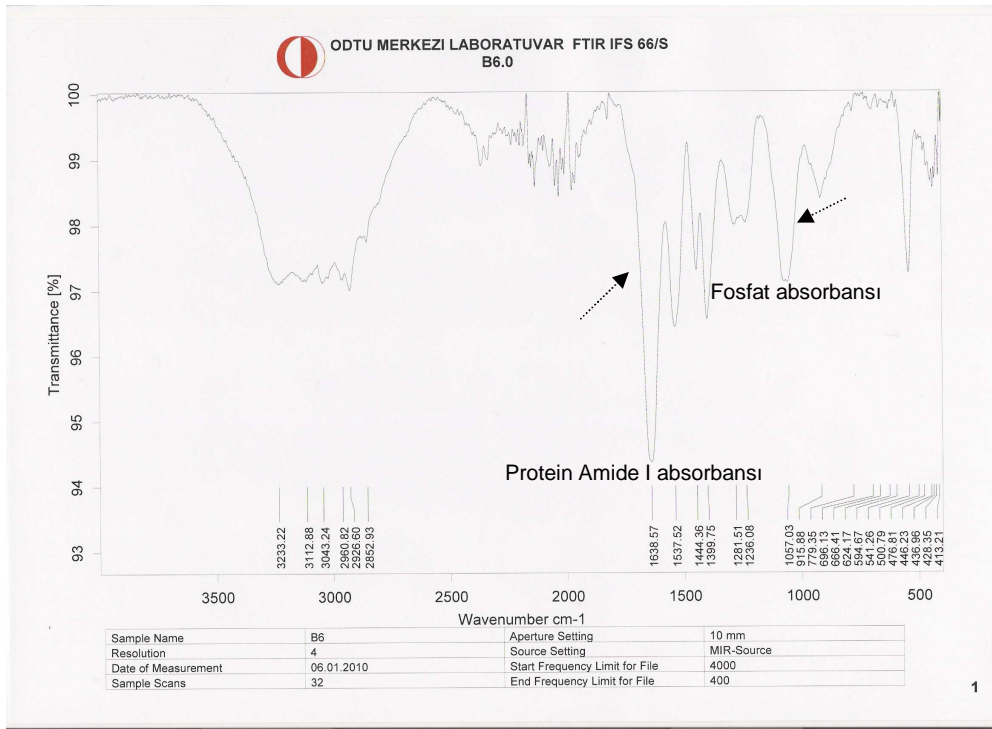


Şekil 4.45. 7 ve 14 günlük inkübasyon sonunda 1300°C’de sinterlenmiş HA disklerinin kalsiyum içeriği (*, #, ¥, +: $p < 0.05$ gruplar arasındaki belirgin farklar).

Genellikle, saf HA ve iyon eklenmiş HA disklerinin üzerine ekilen hücrelerin, 7 ve 14 günlük inkübasyon sonrasında biriktirdiği kalsiyum miktarı, her bir sinterleme sıcaklığında incelendiğinde istatistiksel olarak belirgin farklılıklar göstermemiştir. En az kalsiyum içeriği, yaklaşık 0.015-0.003 (mg Ca/mg protein) miktarlarıyla 14’üncü günde 900°C’de sinterlenmiş HA disklerinde görülmüştür. 1100°C’de ve 1300°C’de sinterlenmiş HA disklerinin 14’üncü günlük inkübasyon sonunda kalsiyum içeriklerinin sırasıyla, yaklaşık 0.02-0.04 ve 0.04-0.06 (mg Ca/mg protein) olduğu belirlenmiştir. En yüksek kalsiyum içeriğine, 1100°C’de sinterlenmiş HA disklerinin üzerine ekilen hücreler tarafından ulaşılmıştır. Bu sinterleme sıcaklığında, 7’nci günde, 2.5YFHA disklerinde diğer iyon eklenmiş disklerle kıyaslandığında en düşük kalsiyum içeriği gözlemlenmiştir. Fakat, hücre büyümesinin devam etmesiyle, 2.5YFHA üzerindeki kalsiyum içeriği beklenmedik bir biçimde artarak, 14 günün sonunda bütün iyon eklenmiş ve 1100 °C’de sinterlenmiş HA diskleri ile benzer değerlere ulaşmıştır. Ayrıca, saf HA ile karşılaştırıldığında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Benzer olarak, Webster ve ark. [101], itriyum eklenmiş HA’in, 7 ve 21 gün sonunda, osteoblastik hücreler tarafından gerçekleştirilen kalsiyum birikimini tetiklemediğini belgelemiştir. Ayrıca, itriyum eklenmiş HA’in, saf HA ile karşılaştırıldığında ALP aktivitesinde gelişme olmadığını tespit

etmiştir [101]. Bu çalışmada da, iyon eklenmiş HA'lerin saf HA ile karşılaştırıldığında ALP aktivitesinde iyileşme olmadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu çalışmadaki bulguların literatürdeki bilgiler ile uyumludur. Ayrıca bu çalışmada, ALP deney sonuçlarının ve kalsiyum birikimi deneyinin sonuçları ile de örtüştüğü görülmektedir. ALP aktivitesinde olduğu gibi, kalsiyum birikimi için de en iyi sonuçlar, 1100°C'de sinterlenen HA disklerine ekilmiş hücreler tarafından elde edilmiştir.

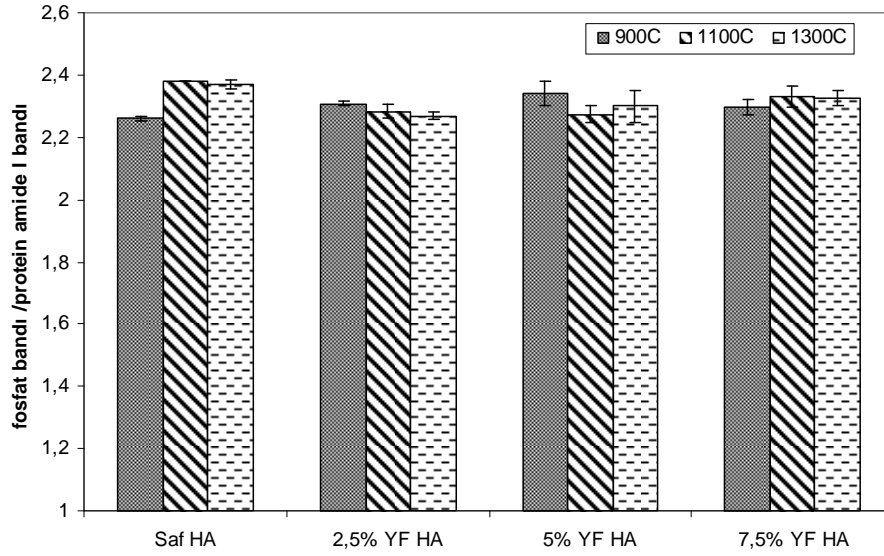
Şekil 4.46'da örnek olarak 1300°C'de sinterlenen saf hidroksiapatit örneğinden elde edilen FTIR-ATR spektroskopi spektrumu verilmiştir. Bütün örnekler için Salaszyk ve ark [108] kullandıkları yöntemle fosfat absorpsiyon alanının protein amide I absorpsiyon alanına oranı hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır (Şekil 4.47).



Şekil 4.46. 1300°C'de sinterlenen saf hidroksiapatit örneğinin elde edilen FTIR-ATR spektroskopisi grafiği.

Şekil 4.47'deki sonuçlara bakıldığında bütün hidroksiapatit örneklerinin hücre minerilizasyonuna elverişli bir ortam sağladığı görülmektedir. Değişik sıcaklıklar ve kompozisyonlar arasında dikkate değer farklılıklar gözlenmemekte, en yüksek mineral içeriğinin ise 1100°C'de sinterlenen saf hidroksiapatit örneğine ait olduğu görülmektedir. Saf HA üzerindeki minerilizasyonun yüksek sinterleme sıcaklarından olumlu etkilendiği, iyon

eklenmiş HA örneklerinde ise sinterleme sıcaklığına bağlı önemli değişiklikler olmadığı gözlenmiştir. Y^{+3} ve F^- iyonları eklenmesinin $900^{\circ}C$ 'de sinterlenen örneklerin mineralizasyonunda artışa sebep olduğu gözlenmektedir. Fakat $1100^{\circ}C$ 'de ve $1300^{\circ}C$ 'de sinterlenen örneklerin hücreler tarafından mineralizasyonunda iyon eklenmesiyle artış gözlenmemiştir. Literatürde Y^{+3} iyonu eklenmiş hidroksiapatit üzerindeki mineralizasyonda artış gözlendiği olmuştur [102]. Ancak bu çalışmada Y^{+3} iyonu ile beraber eklenen F^- iyonunun hidroksiapatitin Ca^{+2} iyon salımında azalmaya yol açarak hücrelerin mineralizasyonunda saf hidroksiapatite kıyala azalmaya neden olabileceği düşünülmektedir [73, 97].



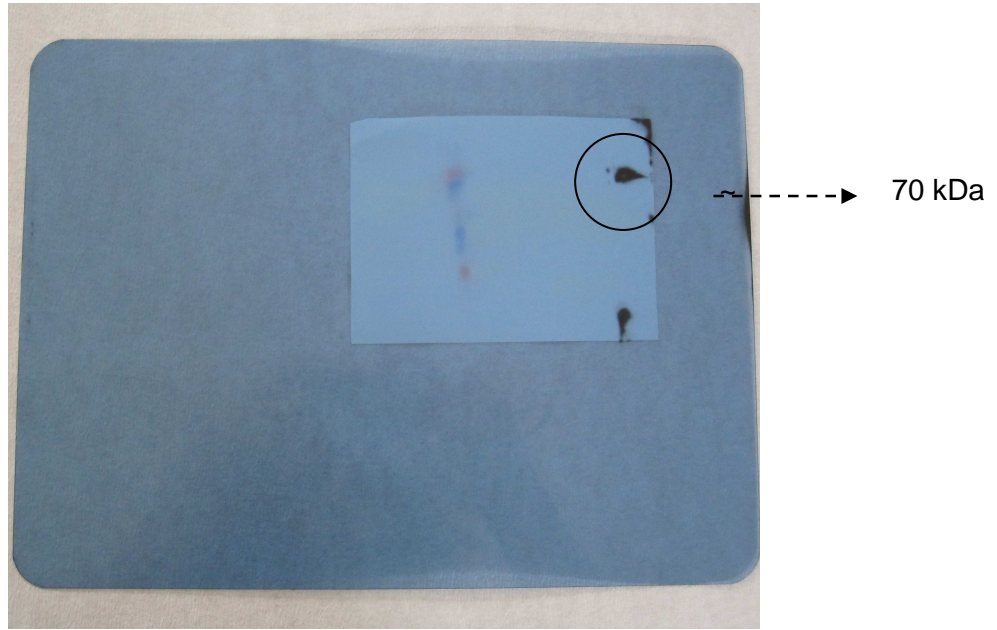
Şekil 4.47. Farklı sıcaklıklarda sinterlenen HA ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerine ekilen Saos-2 hücrelerinin 21 günlük inkübasyon sonucu hücre fazının mineralizasyon düzeylerinin karşılaştırılması.

4.8.6. Kolajen Tip I ve Osteokalsein Birikimi Analizleri

Kolajen tip I kemik dokusunun hücre dışı matriksinde bulunan önemli bir yapısal proteindir. Hücreler tarafından mineralizasyonu sayesinde dokunun tensil kuvvetlere karşı dayanımını sağlamaktadır. Projede Y^{+3} iyonu ile beraber eklenen F^- 'un kemik farklılaşma vasatında kültive edilen Saos-2 hücrelerin kemik yönüne farklılaşmaları üzerindeki etkileri kolajen tip I ve osteokalsein sentezlerinin incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında, osteoblastik farklılaşma incelenmesi için erken farklılaşma markeri olan ALP ve kalsiyum birikimi yanında yapısal protein kolajen tayini ve geç farklılaşma markeri olan osteokalsein kullanılmaktadır. kullanılan göstergelerden biridir. Bu nedenle,

eklenen iyonların miktarlarının ve sinterleme sıcaklığının hücrelerin bu iki farklılaşma markerler üzerindeki etkilerini araştırmak için, saf HA ve iyon eklenmiş HA diskleri üzerindeki hücre dışı kalsiyum miktarları belirlenmiştir. Öncelikle western blotlama yöntemiyle makromolekül seviyesinde deneyler yapılmıştır.

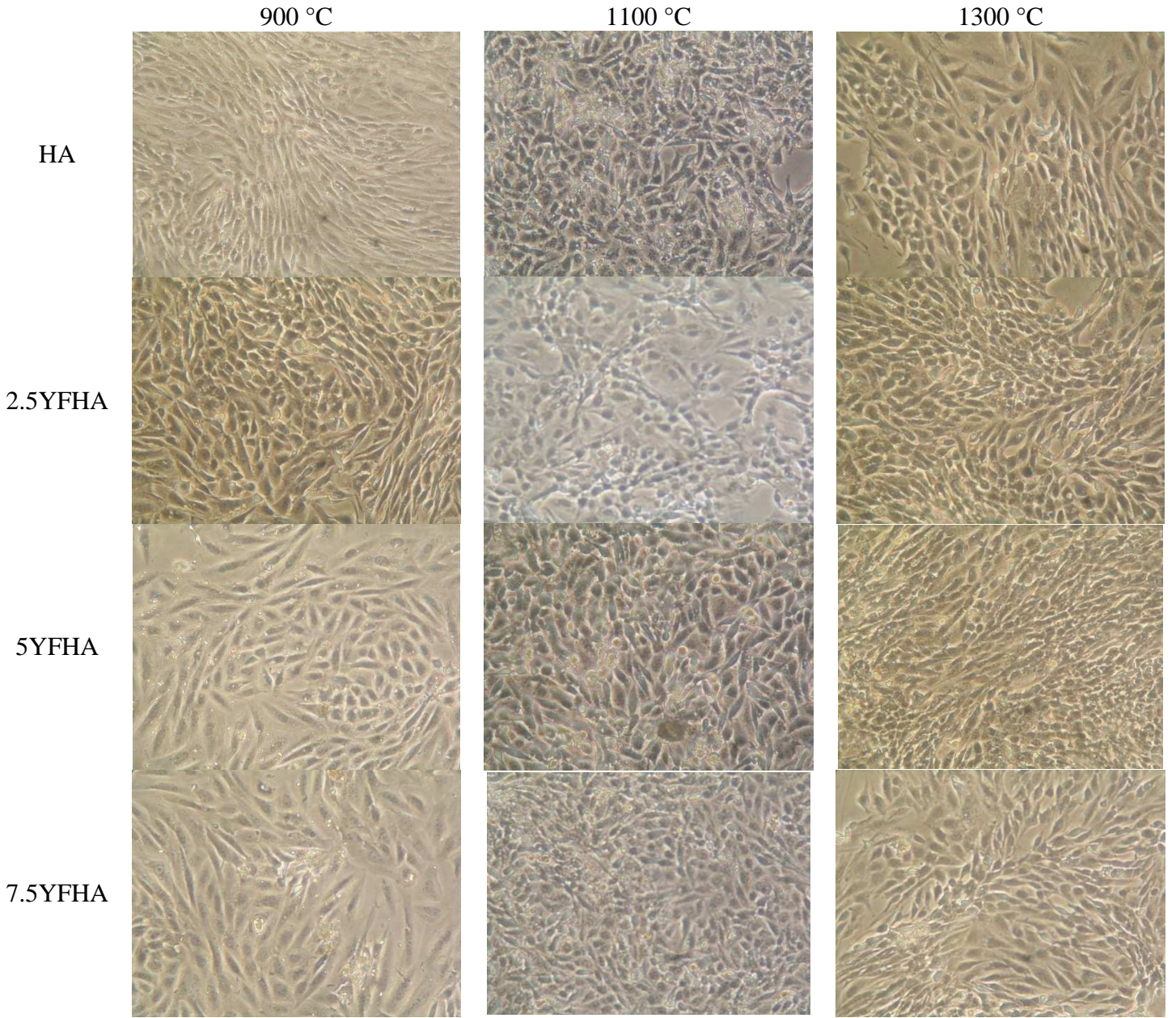
900°C ve 1300°C’de sinterlenen hidroksiapatit diskleri ile kültive edilen hücre lizatlarının western blotting yöntemi ile incelenmesi sonucunda her iki farklılaşma markeri için (kolajen tip I) bant görülmemiştir. Sadece 1100°C’de sinterlenen hidroksiapatit diskleri ile kültive edilen hücre lizatlarından kolajen tip I bantları elde edilmiştir (Şekil 4.48). Filmde daire içerisinde gösterilen bantlar 1100°C’de sinterlenen saf HA diskleri ile kültive edilmiş hücrelerin lizatlarına ait olup, protein sabiti ile kıyaslandığında yaklaşık 70 kDa moleküler ağırlığa tekavül etmektedir. Diğer sıcaklık ve kompozisyonlardaki örneklerle kültive edilen hücre lizatlarından sonuç elde edilememesi sebebiyle yöntem değişikliğine karar verilmiştir. Bu amaçla immunohistokimyasal boyama yöntemiyle yarı kuantitatif yöntem kullanılmıştır.



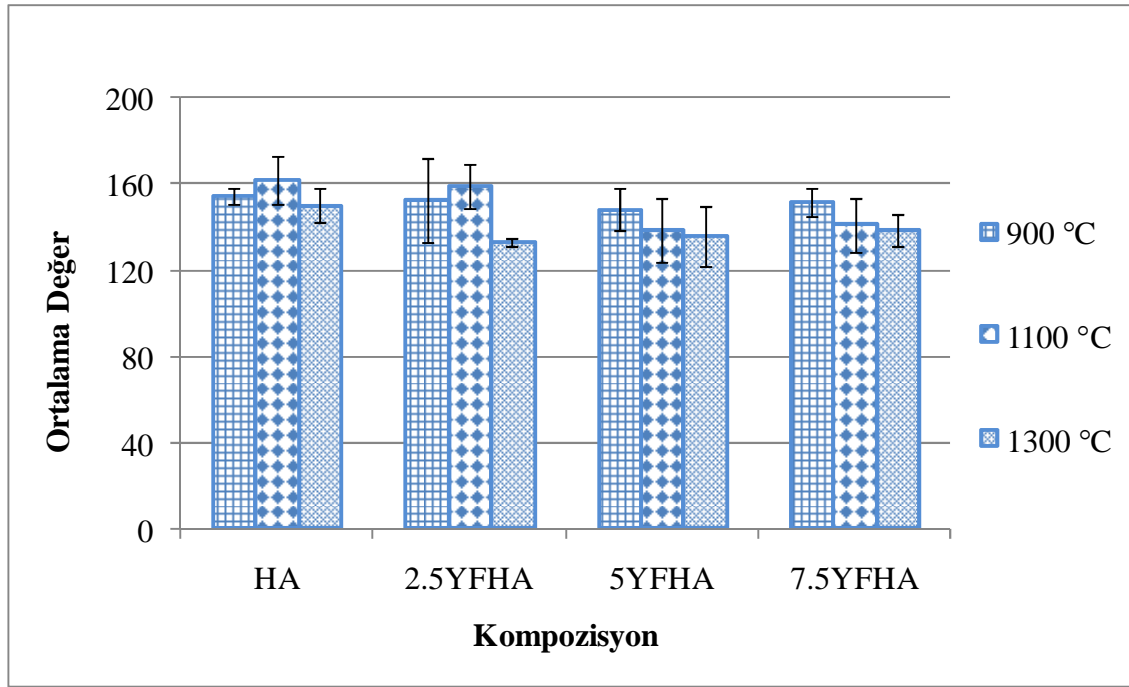
Şekil 4.48. 1100°C’de sinterlenen hidroksiapatit diskleri ile kültive edilen hücre lizatlarının osteokalsein western blotlama sonunda elde edilen X-ray filmi üzerindeki sinyalleri.

Yapılan immunohistokimyasal boyamalar tüm hücrelerin kolajen tip I sentezi gerçekleştirdiğini göstermiştir (Şekiller 4.49 ve 4.50). Ancak ALP sonuçlarına uyumlu olarak 1100°C’de sinterlenmiş 2.5YFHA diskler ile birlikte kültive edilen hücrelerin HA disklerinin bulunduğu kuyucuklardaki hücrelerin sentezlediği miktarlar kadar yüksek sentezlediği

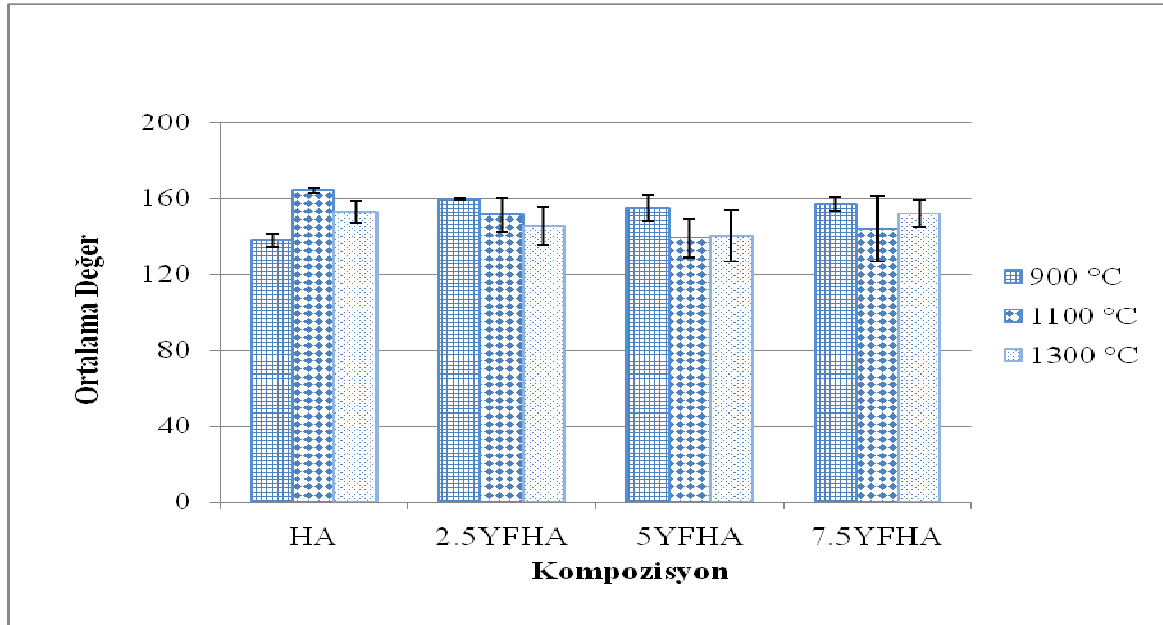
gözenmiştir. Ayrıca Y^{+3} ve F^- iyonları ile zenginleştirilmiş HA diskler arasında en yüksek kolajen biriktirilen diskler olmuştur. Kolajen tip I sonuçlarının aksine $900^{\circ}C$ 'de sinterlenmiş tüm iyonlarla zenginleştirilmiş HA disklerle kültive edilen hücreler saf HA disklerle kültive edilmiş olanlara oranla daha yüksek osteokalsein sentezlediği gözlenmiştir. Bu da iyonlarla HA zenginleştirilmenin ve $900^{\circ}C$ 'de sinterlemenin hücrelerin kemik yönüne farklılaşmalarının ileri aşamalarında pozitif etkisi olduğunu düşündürmektedir (Şekiller 4.51 ve 4.52). Ancak $1100^{\circ}C$ sinterleme sıcaklığında en yüksek değer saf HA disklerinde bulunmuştur. Sinterleme sıcaklığı $1300^{\circ}C$ 'ye çıkartıldığında osteokalsein boyamalarda kompozisyonlar arasında bir farklılık gözlenmemiştir.



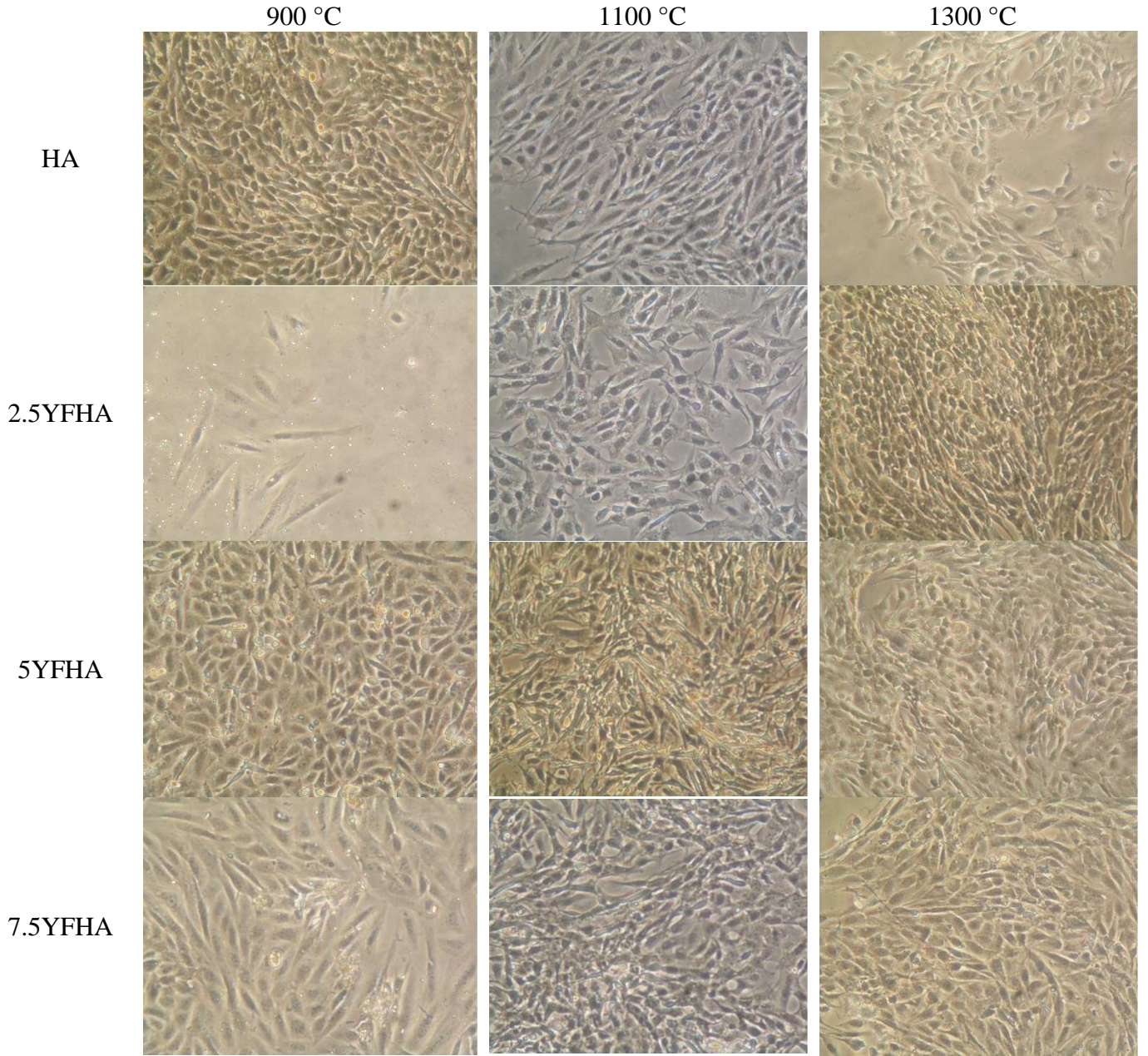
Şekil 4.49. Saf ve Y^{+3} ve F^- iyonları ile zenginleştirilmiş HA diskler ile birlikte kültüre edilen hücrelerin sentezlediği kolajen tip I için immunohistokimyasal boyamalar.



Şekil 4.50. Saf ve Y^{+3} ve F^- iyonları ile zenginleştirilmiş HA diskler ile birlikte kültüre edilen hücrelerin sentezlediği kolajen tip I için immunohistokimyasal boyamalardan Image J yazılımı ile sayısal değerlendirilmesi.



Şekil 4.51. Saf ve Y^{+3} ve F^- iyonları ile zenginleştirilmiş HA diskler ile birlikte kültüre edilen hücrelerin sentezlediği osteokalsein için immunohistokimyasal boyamalardan Image J yazılımı ile sayısal değerlendirilmesi.



Şekil 4.52. Saf ve Y^{+3} ve F^- iyonları ile zenginleştirilmiş HA diskler ile birlikte kültüre edilen hücrelerin sentezlediği osteokalsein için immunohistokimyasal boyamalardan Image J yazılımı ile sayısal değerlendirilmesi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu projede nano boyuttaki HA'ya çeşitli oranlarda itriyum ve flor iyonları eklenerek iç yapı, mekanik ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi çalışılmıştır. En uygun kompozisyon belirlenmiştir.

Nano taneli HA kemikte bulunan doğal HA ile olan tane boyutlarının benzerliğinden dolayı medikal uygulamalarda oldukça büyük öneme sahiptir. HA'yı üretmek için pek çok üretim metodu olmasına rağmen çöktürme yönteminin nano HA üretilmesinde en pratik ve basit metot olduğu tespit edilmiştir. Mikron boyuttaki HA'lar 1100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sinterlenebilmesine rağmen nano HA 900°C sıcaklıkta yüksek yoğunlukta sinterlenbilmiştir. Bu da saflık oranı çok yüksek HA üretilmesini getirmiştir.

Bu projede yürütülen bütün deneysel çalışmalardan elde edilen bulgularla aşağıdaki sonuçlara varılmıştır. Öneriler de bu bölümde sunulmuştur:

Yüksek yoğunlukta malzemeler elde edilmiştir. İyon eklenmiş HA'ların hegzagonal latis parametreleri ve birim hücre hacimleri saf HA'ya göre azalmış olması iyonların yer değiştirdiğini ve HA bozunmadığını göstermektedir. Eklenen elementlerin oranları arttıkça ve sıcaklıklar azaldıkça malzemelerin tane boyutları azalmıştır. Malzemelerin mekanik özellikleri, sinterleme sıcaklıkları ve eklenen elementlerin miktarları ile doğrudan ilgilidir.

Y^{3+} iyonlarının, Ca^{2+} iyonunun yerini alarak HA'nın biyoyumluluğunu arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca mekanik özellikleri hakkında literatürde yeteri kadar çalışma yapılmamış olup bu konu üzerindeki çalışmaların önem kazanacağı düşünülmektedir. Eksi değer sahip özellikle F^- iyonlarının, OH^- nin yerini alması sonucunda HA'nın yüksek sıcaklıklardaki sinterlemeler sonucunda dayanımı ve kararlılığı artırılmıştır.

Eklenen elementler ve artan sinterleme sıcaklıkları hücrelerin daha iyi yapışmasını ve çoğalmasını sağlamıştır. Eklenen iyonların saf HA ile karşılaştırıldıklarında hücrelerin kemik yönüne farklılaşmaları üzerine belirgin pozitif arttırıcı bir etkisi gözlenmemesine rağmen tüm kompozisyonlar ve sinterleme sıcaklıklarında hazırlanan biyomalzemelerin biyoyumlu olduğu bulunmuştur. En yüksek ALP aktiviteleri, kalsiyum, kolajen ve osteokalsein miktarları 1100°C'de sinterlenen malzemeler üzerinde gözlenmiştir. Ayrıca, hücre çalışmalarında en iyi sonuçlar 1100°C'de sinterlenen HA'lerde görülmüştür.

Bütün karakterizasyon metodları neticesinde %2.5 Y and % 2.5 F iyonlarını içeren hidroksiapatit'in en umut verici malzeme olduğu bulunmuştur. Bu malzemenin ilerde in vivo deneylerinin yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] S.J. Kalita, A. Bhardwaj, H.A. Bhatt, Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering, *Materials Science Engineering C* 27 (2007) 441–449.
- [2] Y. Fang, D.K. Agrawal, D.M. Roy, R. Roy, Fabrication of transparent hydroxyapatite ceramics by ambient-pressure sintering, *Materials Letters* 23 (1995) 147-151.
- [3] K. Uematsu, M. Takagi, T. Honda, N. Uchida, K. Saito, Transparent hydroxyapatite prepared by hot isostatic pressing of filter cake, *Journal of the American Ceramic Society* 72 (1989) 1476-1478.
- [4] J. Li, B. Fartash, L. Hermansson, Hydroxyapatite-alumina composites and bone-bonding, *Biomaterials* 16 (1998) 417-422.
- [5] K. Ioku, M. Yoshimura, S. Somiya, Microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite ceramics with zirconia dispersion prepared by post-sintering, *Biomaterials* 11 (1990) 57-61.
- [6] K. Niihara, Indentation microfracture of ceramics—its application and problems, *Journal of the Ceramic Society of Japan* 20 (1985) 12-18.
- [7] G.D. With, H.J.A.V. Dijk, N. Hattu, K. Prijs, Preparation, microstructure and mechanical properties of dense polycrystalline hydroxyapatite, *Journal of Materials Science* 16 (1981) 1592-1598.
- [8] S.V. Bhat, *Biomaterials*, Kluwer Academic Publisher, Norwell, MA, A.B.D., (2002) 174-195.
- [9] S.C. Marks Jr, D.C., Hermey, The Structure and Development of Bone. J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan, editörler. *Principles of Bone Biology*, Academic Press, San Diego, CA, A.B.D., (1996) 3.
- [10] J.B. Park, *Biomaterials Science and Engineering*, Plenum Press, New York, NY, A.B.D. (1987).
- [11] T.M. Keaveny, W.C. Hayes, Mechanical properties of cortical and trabecular bone, *Bone* 7 (1993) 285-344.
- [12] R.G. Handschin, W.B. Stern, X-ray diffraction studies on the lattice perfection of human bone apatite (crista iliaca), *Bone* 16 (1995) 355S-363S.
- [13] J.L. Holden, J.G. Clement, P.P. Phakey, Age and temperature related changes to the ultrastructure and composition of human bone mineral, *Journal of Bone and Mineral Research* 10 (1995) 1400-1409.
- [14] B. Wopenka, J.D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Materials Science and Engineering C* 25 (2005) 131-143.

- [15] M. Clara, F. Magalhaes, P.A. Williams, Apatite Group Minerals: Solubility and Environmental Remediation, *Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues*, Ed: T.M. Letcher, Elsevier B.V. (2007).
- [16] P.J. Panteix, I. Julien, P. Abelard, D. Bernache-Assollant, Influence of cationic vacancies on the ionic conductivity of oxyapatites, *Journal of the European Ceramic Society* 28 (2008) 821-828.
- [17] C. Rey, C. Combey, C. Drouet, H. Sfihi, A. Barroug, Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials, *Materials Science and Engineering C* 27 (2007) 198-205.
- [18] Z. Evis, Al³⁺ doped nano hydroxyapatites and their sintering characteristics, *Journal of the Ceramic Society of Japan* 114 (2006) 1001-1004.
- [19] Z. Evis, Reactions in hydroxylapatite–zirconia composites, *Ceramics International* 33 (2007) 987-991.
- [20] Z. Evis, R.H. Doremus, Hot-pressed hydroxylapatite/monoclinic zirconia composites with improved mechanical properties, *Journal of Materials Science* 42 (2007) 2426-2431.
- [21] S.M. Best, A.E. Porter, E.S. Thian, J. Huang, Bioceramics: Past, present and for the future, *Journal of the European Ceramic Society* 28 (2008) 1319–1327.
- [22] P. Luo, T.G. Nieh, Synthesis of ultrafine hydroxyapatite particles by a spray dry method, *Materials Science and Engineering C* 3 (1995) 75-78.
- [23] J.L. Xu, K.A. Khor, Z.L. Dong, Y.W. Gu, R. Kumar, P. Cheang, Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite powders produced in a radio frequency (rf) thermal plasma, *Materials Science and Engineering A* 374 (2004) 101-108.
- [24] T.A. Kuriakose, S.N. Kalkura, M. Palanichamy, D. Arivuoli, K. Dierks, G. Bocelli, C. Betzel, Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol–gel technique at low temperature, *Journal of Crystal Growth* 263 (2004) 517-523.
- [25] Y. Han, S. Li, X. Wang, X. Chen, Synthesis and sintering of nanocrystalline hydroxyapatite powders by citric acid sol–gel combustion method, *Materials Research Bulletin* 39 (2004) 25-32.
- [26] W.J. Shih, Y.F. Chen, M.C. Wang, M.H. Hon, Crystal growth and morphology of the nano-sized hydroxyapatite powders synthesized from CaHPO₄·2H₂O and CaCO₃ by hydrolysis method, *Journal of Crystal Growth* 270 (2004) 211-218.
- [27] S., Sarig, F. Kahana, Rapid formation of nanocrystalline apatite, *Journal of Crystal Growth* 237 (2002) 55–59.
- [28] C.M. Manuell, M.P. Ferraz, F.J. Monteiro, Synthesis of hydroxyapatite and tri calcium phosphate nanoparticles-preliminary studies, *Bioceramics* 15 (2003) 240–242.

- [29] Z. Evis, R.H. Doremus, Effect of AlF_3 , CaF_2 and MgF_2 on hot-pressed hydroxyapatite–nanophase alpha-alumina composites, *Materials Research Bulletin* 43 (2008) 2643-2651.
- [30] M. Jarcho, C.H. Bolen, M.B. Thomas, J. Bobick, J.F. Kay, R.H. Doremus, Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form, *Journal of Materials Science* 11 (1976) 2027-2035.
- [31] I. Mobasherpour, M.S. Heshajin, A. Kazemzadeh, M. Zakeri, Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method, *Journal of Alloys and Compounds* 430 (2007) 330–333.
- [32] T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics, *Biomaterials* 21 (2000) 1803-1810.
- [33] T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics, *Biomaterials* 22 (2001) 1327–1333.
- [34] M. Akao, H. Aoki, K. Kato, Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications, *Journal of Materials Science* 16 (1981) 809-812.
- [35] A.J. Ruys, M. Wei, C.C. Sorrell, M.R. Dickson, A. Brandwood, B.K. Milthorpe, Sintering effects on the strength of hydroxyapatite, *Biomaterials* 16 (1995) 409-415.
- [36] J.D. Santos, J.C. Knowles, R.L. Reis, F.J. Monteiro, G.W. Hastings, Microstructural characterization of glass-reinforced hydroxyapatite composites, *Biomaterials* 15 (1994) 5-10.
- [37] E.S. Ahn, N.J. Gleason, A. Nakahira, J.Y. Ying, Nanostructure processing of hydroxyapatite-based bioceramics, *Nano Letters* 1 (2001) 149-153.
- [38] R. Atsala, M.J. Stott, First principles investigation of mineral component of bone: CO_3 substitutions in hydroxyapatite, *Chemistry of Materials* 17 (2005) 4125-4133.
- [39] A.S. Posner, A. Perloff, A.F. Diorio, Refinement of the hydroxyapatite structure, *Acta Crystallographica* 11 (1958) 308-309.
- [40] M.E. Fleet, X. Liu, Site preference of rare earth elements in hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, *Journal of Solid State Chemistry* 149 (2000) 391-398.
- [41] T. Ikoma, A. Yamazaki, S. Nakamura, M. Akao, Preparation and structure refinement of monoclinic hydroxyapatite, *Journal of Solid State Chemistry* 144 (1999) 272-276.
- [42] L.L. Helson, J. Wilson, An Introduction to Bioceramics, World Scientific (1993) 139-180.
- [43] S. Pramanik, A.K. Agarwal, K.N. Rai, A. Garg, Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process, *Ceramics International* 33 (2007) 419–426.
- [44] G.K. Lim, J. Wang, S.C. Ng, C.H. Chew, L.M. Gan, Processing of hydroxyapatite via microemulsion and emulsion routes, *Biomaterials* 18 (1997) 1433-1439.

- [45] H.S. Liu, T.S. Chin, L.S. Lai, S.Y. Chiu, K.H. Chung, C.S. Chang, M.T. Lui, Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method, *Ceramics International* 23 (1997) 19-25.
- [46] W. Feng, L. Mu-sen, L. Yu-peng, Q. Yong-xin, A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders, *Materials Letters* 59 (2005) 916– 919.
- [47] B. Başar, Structural, mechanical and biocompatibility investigations of yttrium and fluoride doped nano hydroxyapatite, Yüksek Lisans Tezi, Mühendislik Bilimleri Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, (2009).
- [48] D.M. Cullinane, T.A. Einhorn, Biomechanics of Bone, *Principles of Bone Biology*, Second Edition, Volume 1, (2002) 17–32.
- [49] G. Bezzi, G. Celotti, E. Landi, T.M.G. La Torretta, I. Sopyan, A. Tampieri, A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation, *Materials Chemistry and Physics* 78 (2003) 816–824.
- [50] N.Y. Mostafa, Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes, *Materials Chemistry and Physics* 94 (2005) 333–341.
- [51] A. Banerjee, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, densification and cell-materials interaction, *Materials Science and Engineering C* 27 (2007) 729–735.
- [52] T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios, *Bioceramics*, Ed: R.Z. LeGeros ve J.P. LeGeros, World Scientific, New York, NY, A.B.D., 11 (1998) 273-276.
- [53] T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios, Osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *Biomaterials* 20 (1999) 1222-1227.
- [54] E. Fernández, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, S.M. Best, Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10 (1999) 169-176.
- [55] T.S.B. Narasaraju, D.E. Phebe, Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite, *Journal of Materials Science* 31 (1996) 1-21.
- [56] C. Ergun, T.J. Webster, R. Bizios, R.H. Doremus, Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. I. Structure and microstructure, *Journal of Biomedical Materials Research* 59 (2002) 305-311.
- [57] T.J. Webster, E.A. Massa-Schlueter, J.L. Smith, E.B. Slamovich, Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations, *Biomaterials* 25 (2004) 2111-2121.
- [58] Z.Y. Li, W.M. Lam, C. Yang, B. Xu, G.X. Ni, S.A. Abbah, K.M.C. Cheung, K.D.K. Luk, W.W. Lu, Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite, *Biomaterials* 28 (2007) 1452–1460.

- [59] R.Z. LeGeros, S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares, J.P. LeGeros, Biphasic calcium phosphate ceramics: Preparation, properties and applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14 (2003) 201-209.
- [60] I. Kim, P.N. Kumt, Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder, *Materials Science and Engineering B* 111 (2004) 232-236.
- [61] S.R. Kim, J.H. Lee, Y.T. Kim, D.H. Riu, S.J. Jung, Y.J. Lee, S.C. Chung, Y.H. Kim, Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors, *Biomaterials* 24 (2003) 1389-1398.
- [62] S. Kannan, A. Rebelo, J.M.F. Ferreira, Novel synthesis and structural characterization of fluorine and chlorine co-substituted hydroxyapatites, *Journal of Inorganic Biochemistry* 100 (2006) 1692-1697.
- [63] T.N. Kim, Q.L. Feng, J.O. Kim, J. Wu, H. Wang, G.C. Chen, F.Z. Cui, Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9 (1998) 129-134.
- [64] J.E. Hilliard, Estimating grain size by the intercept method, *Metal Progress Data Sheet*, ss.99-102, (1964).
- [65] H. Yang, L. Zhang, K.-W. Xu, Effect of storing on the microstructure of Ag/Cu/HA powder, *Ceramics International* 35 (2009) 1595-1601.
- [66] R.D. Shannon, Revised effective ionic-radii systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides, *Acta Crystallographica A*, 32 (1976) 751-767.
- [67] S.J. Kalita, H.A. Bhatt, Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: synthesis and characterization, *Materials Science and Engineering C* 27 (2007) 837-848.
- [68] Y. Chen, X. Miao, Effect of fluorine addition on the corrosion resistance of hydroxyapatite ceramics, *Ceramics International* 30 (2004) 1961-1965.
- [69] T.J. Webster, C.Ergun, R.H. Doremus, R. Bizios, Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion, *Journal of Biomedical Research* 59 (2002) 312-317.
- [70] M. Sato, M.A. Sambito, A. Aslani, N.M. Kalkhoran, E.B. Slamovich, T.J. Webster, Increased osteoblast functions on undoped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium, *Biomaterials* 27 (2006) 2358-2369.
- [71] H. Eslami, M. Solati-Hashjin, M. Tahriri, The comparison of powder characteristics and physicochemical, mechanical and biological properties between nanostructure ceramics of hydroxyapatite and fluoridated hydroxyapatite, *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 1387-1398.

- [72] H. Qu, M. Wei, The effect of fluoride contents in fluoridated hydroxyapatite on osteoblast behavior, *Acta Biomaterialia* 2 (2006) 113–119.
- [73] M.H. Fathi, E.M. Zahrani, Mechanical alloying synthesis and bioactivity evaluation of nanocrystalline fluoridated hydroxyapatite, *Journal of Crystal Growth* 311 (2009) 1392–1403.
- [74] K.A. Gross, L.M. Rodriguez-Lorenzo, Sintered hydroxyfluorapatites. Part II: Mechanical properties of solid solutions determined by microindentation, *Biomaterials* 25 (2004) 1385–1394.
- [75] B.D. Cullity, *Elements of x-ray diffraction*, 2nd ed., Addison-Wesley, Reading, MA, Bölüm 14 (1978).
- [76] R.P. Ojdrovic, A.L. Stojimirovic, H.J Petroski., Effect of age on splitting tensile strength and fracture resistance of concrete, *Cement Concrete Research*, 17 (1987) 70-76.
- [77] A. Shafi, A. Peutzfeldt, E. Asmussen, K. Gotfredsen, Effect of surface treatment of prefabricated posts on bonding of resin cement, *Operative Dentistry*, 29 (2004) 60-68.
- [78] Z.C. Li, S.N. White, Mechanical properties of dental luting cements, *J. Prosthet. Dent.* 81 (1999) 597-609.
- [79] M. Atai, M. Nekoomanesh, S.A. Hashemi, S. Amani, Physical and mechanical properties of an experimental dental composite based on a new monomer, *Dental Materials* 20 (2004) 663-668.
- [80] S.H. Dickens, G.M. Flaim, S. Takagi, Mechanical properties and biochemical activity of remineralizing resin-based Ca-PO₄ cements, *Dental Materials*, 19 (2003) 558-566.
- [81] N. Hersek, S. Canay, K. Akca, Y. Ciftçi, Tensile strength of type IV dental stones dried in a microwave oven, *Journal of Prosthetic Dentistry* 87 (2002) 499-502.
- [82] M.B. Thomas, M. Jarcho, R.L Salsbury, R.H. Doremus, Dense hydroxylapatite: Fatigue and fracture strength after various treatments, from diametral tests, *Journal of Materials Science*, 15 (1980) 891-894.
- [83] Z. Evis, F. Ozturk, Investigation of tensile strength of hydroxyapatite with various porosities by diametral strength test, *Materials Science and Technology* 24 (2008) 474-478.
- [84] C.B. Ponton R.D. Rawlings, Vickers indentation fracture toughness test part I: Review of literature and formulation of standardized indentation toughness equation, *Materials Science and Technology*, 5 (1989) 865-872.
- [85] A. Slosarczyk, J. Bialoskorski, Hardness and fracture toughness of dense calcium phosphate-based materials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9 (1998) 103-108.

- [86] R.A. Young, Implications of atomic substitutions and other structural details in apatites, *Journal of Dental Researches* 53 (1974) 193-203.
- [87] F. Öztürk, Z. Evis, S. Toros, Hidroksiapatitin diyametral mukavemet testinin sonlu elemanlar metodu ile simülasyonu, *V. TÜRKİYE Abaqus Kullanıcılar Toplantısı Sunum Kitabı*, İstanbul, Türkiye, 8-9 Kasım 2007. sayfa: 231-244.
- [88] O. Prokopiev, I. Sevostianov, Dependence of the mechanical properties of sintered hydroxyapatite on the sintering temperature, *Materials Science and Engineering A* 431 (2006) 218.
- [89] J.C. Elliot, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam (1994).
- [90] B. Cengiz, Y. Gokce, N. Yildiz, Z. Aktas, A. Calimli, Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 322 (2008) 29–33.
- [91] D.C. O’Shea, M.L. Bartlett, R.A. Young, Compositional analysis of apatites with laser-Raman spectroscopy: (OH,F,Cl) apatites, *Arch. Oral Biol.*, 19 (1974) 995–1006.
- [92] G., Muralithran, S. Ramesh, The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite, *Ceramics International*, 26 (2000) 221-230.
- [93] S. Ramesh, C.Y. Tan, I. Sopyan, M. Hamdi, W.D. Teng, Consolidation of nanocrystalline hydroxyapatite powder, *Science and Technology of Advanced Materials*, 8 (2007) 124–130.
- [94] K.A. Gross, L.M. Rodriguez-Lorenzo, Sintered hydroxyfluorapatites. Part I: Sintering ability of precipitated solid solution powders, *Biomaterials*, 25 (2004) 1375-1384.
- [95] G. Göller, F.N. Oktar Sintering effects on mechanical properties of biologically derived dentine hydroxyapatite, *Materials Letters* 56 (2002) 142-147.
- [96] S. Ramesh, C.Y. Tan, S.B. Bhaduri, W.D. Teng, Rapid densification of nanocrystalline hydroxyapatite for biomedical applications, *Ceramics International*, 33 (2007) 1363-1367.
- [97] K. Cheng, W. Weng, H. Wang, S. Zhang, In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings, *Biomaterials* 26 (2005) 6288–6295.
- [98] M. Inoue, R.Z. LeGeros, M. Inoue, H. Tsujigiwa, H. Nagatsuka, T. Yamamoto, N. Nagai, In vitro response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 70 (2004) 585–593.
- [99] H. Kim, Y. Kong, J.C. Knowles, Fluor-hydroxyapatite sol–gel coating on titanium substrate for hard tissue implants, *Biomaterials* 25 (2004) 3351–3358.

- [100] T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R. Bizios, Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium: II Mechanisms of osteoblast adhesion, *Journal of Biomedical Materials Research* 59 (2002) 312–317.
- [101] T.J. Webster, E.A. Massa-Schlueter, J.L. Smith, E.B. Slamovich, Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations, *Biomaterials* 25 (2004) 2111–2121.
- [102] M. Sato, M.A. Sambito, A. Aslani, N.M. Kalkhoran, E.B. Slamovich, T.J. Webster, Increased osteoblast functions on undoped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium, *Biomaterials* 27 (2006) 2358–2369.
- [103] T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios, Osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *Biomaterials*, 20 (1999) 1221–1227.
- [104] T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios, Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics, *Biomaterials* 21 (2000) 1803–1810.
- [105] T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios, Nanoceramic surface roughness enhances osteoblasts and osteoclast functions for improved orthopedic/dental implant efficacy, *Scripta Materialia* 44 (2001) 1639–1642.
- [106] J.R. Farley, J.E. Wergedal, D.J. Baylink, Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells, *Science* 222 (1983) 330–332.
- [107] M. Sivakumar, I. Manjubala, Preparation of hydroxyapatite/fluorapatite zirconia composites using Indian corals for biomedical applications, *Materials Letters* 50 (2001) 199–205.
- [108] R.M. Salaszyk, W.A. Williams, A. Boskey, A. Batorsky, A. G.E. Plopper, Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1 (2004) 24–34.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 105M271
Proje Başlığı: Y^{+3} ve F^{-} Eklenmiş Nano-Hidroksiapatit Biyoseramiklerinin Çöktürme Yöntemi ile Üretilerek İç Yapı, Mekanik ve Biyouyumluluk Özellikleri Yönünden İncelenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Zafer EVİS, Doç. Dr. Ayşen TEZCANER, Yrd. Doç. Dr. Dilek KESKİN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Bölümü İnönü Bulvarı 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.06.2006-01.11.2010
Öz (en çok 70 kelime) Nano boyuttaki hidroksiapatite (HA) çeşitli oranlarda itriyum ve flor elementleri eklenerek iç yapı, mekanik ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi ele alınmıştır. Saf ve iyon eklenmiş HA'lar çöktürme metodu ile sentezlenip farklı sıcaklıklarda sinterlenmişlerdir. Yüksek yoğunlukta malzemeler elde edilmiş olup ikincil faz oluşumlarına rastlanmamıştır. Eklenen elementler ve artan sıcaklıklar hücrelerin daha iyi yapışmasını ve çoğalmasını sağlamıştır. Deneysel çalışmanın neticesinde, 2.5YFHA'nın saf HA'ya göre en umut verici malzeme olduğu görülmüştür.
Anahtar Kelimeler: Nano Hidroksiapatit, İtريyum, Flor, Mekanik Özellikler, Biyolojik Özellikler
Projeden Yapılan Yayınlar: Uluslararası SCI endeksine giren dergide yayımlanmış makale B. Basar ve Z. Evis, "Structural investigation of nano hydroxyapatite doped with Y^{3+} and F^{-} ions", <i>Materials Science and Technology</i> , 25, 794-798 (2009) (SCI). B. Basar, A. Tezcaner, D. Keskin, Z. Evis, "Improvements in microstructural, mechanical, and biocompatibility properties of nano-sized hydroxyapatites doped with yttrium and fluoride", <i>Ceramics International</i> , 36, 1633-1643 (2010) (SCI).. Z. Evis, B. Basar ve Z.P. Sun, "Diametral strength testing of hydroxyapatites doped with yttrium and fluoride", <i>Advances in Applied Ceramics: Structural, Functional and Bioceramics</i> , 109, 383-388, (2010) (SCI).

S.M. Toker, A. Tezcaner ve Z. Evis, “Microstructure, microhardness, and biocompatibility characteristics of yttrium hydroxyapatite doped with fluoride”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (2010) Basımda (SCI).

Yurtdışı Konferans Sunumu

B. Basar, Z. Evis ve A. Tezcaner, “Mechanical and biocompatibility of yttrium and fluorine doped hydroxyapatite”, 33th International Conference and Exposition on Advanced Ceramics and Composites, Daytona Beach, FL, ABD, 18-23 Ocak 2009.

Yurtiçi Konferans Sunumu

B. Basar ve Z. Evis “Structural investigation of nano hydroxyapatite doped with Y³⁺ and F⁻ ions”, 13. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, Ankara, Türkiye, 29-31 Mayıs 2008.

B. Basar, S.M. Toker, A. Tezcaner, D. Keskin, Z. Evis, “Improvements in phase stability and sinterability of yttrium and fluoride doped nano hydroxyapatites”, V. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, Eskişehir, Türkiye, 8-12 Haziran 2009.

S.M. Toker, Z. Evis, A. Tezcaner, “İtiryum ve flor ilave edilmiş hidroksiapatitin mikroyapı, mikrosertlik ve biyoyumluluk yönlerinden incelenmesi”, 15. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, Antalya, Türkiye, 21-24 Nisan 2010.

Yüksek Lisans Tezi

Burçin Başar, “İtiryum ve flor eklenmiş nano-hidroksiapatitin iç yapısı, mekanik, ve biyoyumluluk incelemeleri”, Mühendislik Bilimleri Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Danışman: Y. Doç. Dr. Zafer Evis, Eş Danışman: Y. Doç. Dr. Ayşen Tezcaner, (2009).

Sıdıka Mine Toker, “Flor iyonları ilave edilmiş itiryum hidroksiapatitin mikroyapısı, mikrosertlik ve biyoyumluluk özelliklerinin incelenmesi”, Biyomedikal Mühendisliği Programı, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Danışman: Doç. Dr. Zafer Evis, Eş Danışman: Doç. Dr. Caner Durucan, (2010).