

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KEMİK DOKU İSKELELERİ İÇİN BİYOAKTİF CAM ESASLI
NANOKOMPOZİT MALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUĞRA SÖKMEN

DENİZLİ, TEMMUZ - 2024

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**KEMİK DOKU İSKELELERİ İÇİN BİYOAKTİF CAM ESASLI
NANOKOMPOZİT MALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUĞRA SÖKMEN

DENİZLİ, TEMMUZ - 2024

Bu tez alışması Pamukkale Üniversitesi BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi) tarafından 2022FEBE048 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

BUĞRA SÖKMEN

ÖZET

**KEMİK DOKU İSKELELERİ İÇİN BİYOAKTİF CAM ESASLI
NANOKOMPOZİT MALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BUĞRA SÖKMEN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. YUSUF ÖZCAN)
(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. CEM GÖK)
DENİZLİ, TEMMUZ – 2024**

Canlılar, yaşam döngülerinin belirli evrelerinde hastalıklar, kazalar ve yaşlanmanın etkisiyle bazı doku ve organlarında işlev kaybı yaşamaya başlar. Bu sorunlar beraberinde iskelet sisteminde oluşan sıkıntıları da getirmektedir. Kemiklerde oluşan çatlaklar, kırıklar veya uzuvların tamamen kaybedilmesine kadar gidebilen ciddi sağlık sorunları bu problemlerden bazılarıdır. Bu sıkıntıların giderilmesinde biyomalzemeler ve doku mühendisliği uygulamaları büyük rol oynamaktadır. Kullanılan biyomalzemeler hasarlı dokuya destek sağlayacak şekilde hazırlanabildiği gibi hasarlı dokunun yerini alıp dokunun bulunduğu bölgede tedaviyi başlatabilecek özelliklere de sahip olabilmektedir.

Bu tez çalışmasında kemik doku mühendisliği ve hasarlı kemik dokularının tedavisinde kullanılan biyoaktif camlar sol-jel yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Çalışmada katkı malzemeleri olarak doğal bir silika kaynağı olan diatomları içeren tortul bir kayaç türü olan diatomit ve alumina nanopartikülleri kullanılmıştır. Üretilen toz numunelerin karakterizasyonları yapılmış, ardından bu numunelerle polimer sünger kopyalama yöntemi kullanılarak kemik doku iskeleleri üretilmiştir. Doku iskelelerine L929 hücre hattı kullanılarak biyoyuyluluk ve yapay vücut sıvısı (SBF) kullanılarak biyoaktivite analizleri yapılmış, yüzey morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. 30 gün süreyle SBF içerisinde bekletilen doku iskelelerinin hepsinin yüzeyinde apatit oluşumu gözlenmiştir olup buna ek olarak diatomit ile katkılanmış numunelerde apatit oluşma hızının ve yoğunluğunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. SBF’de bekletilmiş olan tüm numunelerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) sonuçlarında apatit oluşumuna karakteristik olan 550-600 cm⁻¹ bandı ve X-Işını Difraksiyon (XRD) sonuçlarında 26° ile 32°’de apatitleşmeye özgü pikler gözlenmiştir. L929 hücre hattı ile yapılan kültür ve sitotoksikite çalışmaları sonucunda malzeme morfolojisinin hücre tutunmasını destekleyici bir yapıda olduğu gözlenmiş ve malzemelerde uygulama esnasında negatif etkiye sebep olacak ciddi bir toksik etkiye rastlanmadığı görülmüştür.

Çalışmada hazırlanan malzemeler kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak malzemelerden beklenen özellikleri fazlasıyla göstermiş olup biyoaktif cama yapılan katkılar ile malzeme özelliklerinin artırılmış olmasıyla tezin amacına uygun nanokompozit malzemeler üretilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELEER: BİYOAKTİF CAM, KEMİK DOKU İSKELESİ,
DİATOMİT, DOKU MÜHENDİSLİĞİ**

ABSTRACT

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE GLASS
BASED NANOCOMPOSITE MATERIALS FOR BONE TISSUE
SCAFFOLDS
MSC THESIS
BUĞRA SÖKMEN
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOMEDICAL ENGINEERING DEPARTMENT**

**(SUPERVISOR: PROF. DR. YUSUF ÖZCAN)
(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. CEM GÖK)
DENİZLİ, JULY 2024**

Throughout their life cycles, organisms experience functional loss in some tissues and organs due to diseases, accidents, and the effects of aging. These issues often lead to problems within the skeletal system, such as cracks, fractures, or even the complete loss of limbs. Addressing these problems, biomaterials and tissue engineering applications play a significant role. Biomaterials used can be designed to support damaged tissue or replace it and initiate the healing process in the affected area.

In this research, bioactive glasses used in bone tissue engineering and the treatment of damaged bone tissues were synthesized using the sol-gel method. Diatomite, a sedimentary rock containing diatoms, which is a natural silica source, and alumina nanoparticles were used as additives. The produced powder samples were characterized, and then bone tissue scaffolds were fabricated using the polymer sponge replication method. Biocompatibility and bioactivity analyses of the scaffolds were conducted using the L929 cell line and simulated body fluid (SBF), and their surface morphologies were examined with Scanning Electron Microscope (SEM). After keeping the scaffolds in SBF for 30 days, apatite formation was observed on the surface of all scaffolds. Additionally, it was found that samples with diatomite exhibited a higher rate and density of apatite formation. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) of the samples in SBF showed the characteristic $550\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ band for apatite formation, and X-Ray Diffraction (XRD) results showed peaks specific to apatite at 26° and 32° . Culture and cytotoxicity studies with the L929 cell line indicated that the material morphology supports cell adhesion and showed no significant toxic effects during application.

The materials prepared in this study demonstrated the desired properties for use in bone tissue engineering applications. The additives to the bioactive glass enhanced the material properties, resulting in the successful production of nanocomposite materials aligned with the thesis objectives.

**KEYWORDS: BIOACTIVE GLASS, BONE TISSUE SCAFFOLD,
DIATOMITE, TISSUE ENGINEERING**

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOLE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Klinik Problem ve Tezin Amacı.....	1
1.2 Literatürdeki Çalışmalar.....	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 Kemik Doku.....	6
2.1.1 Kemik Yapısı ve Özellikleri.....	6
2.1.2 Kemik Doku Hücreleri ve Özellikleri.....	8
2.1.3 Kemik Doku Zedelenmesi, Enflamasyon ve İyileşme Süreci.....	9
2.2 Kemik Doku Mühendisliği.....	10
2.2.1 Kemik Doku İskeleleri.....	11
2.2.1.1 Doku İskelelerinde Bulunması Gereken Özellikler.....	11
2.2.1.2 Doku İskelesi Üretim Yöntemleri.....	14
2.2.1.3 Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Malzemeler.....	17
2.3 Biyoseramikler.....	18
2.3.1 Diatomit.....	20
2.3.2 Nano Alümina.....	21
2.3.3 Biyoaktif Camlar.....	22
2.3.3.1 Biyoaktif Camların Üretim Yöntemleri.....	25
2.3.3.2 Biyoaktif Camların Çalışma Mekanizması.....	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	30
3.2 Deneysel Yöntem.....	30
3.2.1 Sol-Jel Yöntemi ile Biyoaktif Camların Hazırlanması.....	31
3.2.1.1 BG Numunelerinin Hazırlanması.....	31
3.2.1.2 BGD Numunelerinin Hazırlanması.....	32
3.2.1.3 BGA Numunelerinin Hazırlanması.....	34
3.2.1.4 BGDA Numunelerinin Hazırlanması.....	34
3.2.2 Biyoaktif Cam Numunelerinin Karakterizasyonları.....	36
3.2.2.1 FT-IR Analizi.....	36
3.2.3 Polimer Sünger Kopyalama Yöntemiyle Kemik Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	36
3.2.3.1 Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	37
3.2.4 Kemik Doku İskelelerinin Karakterizasyonları.....	38
3.2.4.1 SEM Analizi.....	38
3.2.4.2 FT-IR Analizi.....	38
3.2.4.3 XRD Analizi.....	39
3.2.5 Kemik Doku İskelelerine Yapay Vücut Sıvısı Uygulaması.....	39

3.2.5.1	Yapay Vücut Sıvısı Uygulaması Sonrası SEM Analizi.....	40
3.2.5.2	Yapay Vücut Sıvısı Uygulaması Sonrası FT-IR Analizi	40
3.2.6	Doku İskelelerinin Hücre Kültürü Aşamaları.....	41
3.2.6.1	Sitotoksosite Çalışmaları için Doku iskelelerinin Hazırlığı.....	41
3.2.6.2	Hücre Kültürü ve Sitotoksosite Testi.....	41
3.2.6.3	Floresan Mikroskobu Çalışmaları.....	42
3.2.6.4	Doku İskelelerine Hücre Ekimi.....	43
3.2.6.5	Morfolojik Analizler ve SEM Görüntülemesi.....	43
3.2.7	İstatistiksel Analiz.....	44
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	45
4.1	Optik Mikroskop Görüntüleri.....	45
4.2	Biyoaktif Cam Numunelerinin Analizleri	46
4.2.1	200 ve 700 derecelerdeki numunelerin FT-IR Analizi Sonuçları	46
4.3	Biyoaktivite Testi Yapılmış Numunelerin Analiz Sonuçları	53
4.3.1	SEM/EDS Analizi.....	53
4.3.2	FT-IR Analizi.....	60
4.3.3	XRD Analizi	62
4.4	L929 Hücre Hattıyla Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar ..	63
4.4.1	Sitotoksitite Testi Sonuçları.....	63
4.4.2	Floresan Mikroskop Çalışma Sonuçları.....	64
4.4.3	L929 Hücre Hattı Uygulanan Doku İskelelerinin SEM Analizi..	65
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	71
6.	KAYNAKLAR.....	74
7.	ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kemiğin hiyerarşik yapısı.....	7
Şekil 2.2: Kemik doku hücreleri. Sırasıyla; osteositler, osteoblastlar, osteojenik hücreler ve osteoklastlar.....	9
Şekil 2.3: Sol-jel yöntemi sonucunda oluşan farklı ürünler.....	14
Şekil 2.4: Sünger kopyalama yöntemi.....	16
Şekil 2.5: Seramik malzemelerin sinterleme süreci.....	19
Şekil 2.6: Diatomların sınıflandırılması.....	20
Şekil 2.7: Nano alumina tozlarının biyomedikal uygulamaları.....	21
Şekil 2.8: Biyoaktif camların üretim yöntemleri.....	25
Şekil 2.9: Biyoaktif camların sol-jel yöntemiyle sentezlenmesi.....	27
Şekil 2.10: Biyoaktif camların çalışma mekanizması.....	29
Şekil 3.1: 700 °C’de ısıtılmış diatomit ve içerdiği diatom kalıntıları.....	33
Şekil 3.2: 200 °C ve 700 °C’de ısıtılmış uygulanmış BG, BGD, BGA ve BGDA numuneleri.....	35
Şekil 3.3: Sol-jel yöntemiyle biyoaktif cam sentezinde kullanılan proses.....	36
Şekil 3.4: Kemik doku iskelelerinin hazırlanışı.....	37
Şekil 3.5: L929 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü.....	42
Şekil 3.6: 6’lı kuyucuklarda besiyeri içerisinde bekletilen doku iskeleleri.....	43
Şekil 4.1: Numunelerinin 700 °C’deki ısıtılmış sonrası optik mikroskop görüntüleri.....	45
Şekil 4.2: 200 ve 700 °C’deki toz biyoaktif camların FT-IR grafikleri.....	46
Şekil 4.3: Biyoyumluluk ve biyoaktivite testi uygulanmak üzere BG numuneleri kullanılarak hazırlanmış doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x, f) 10000x.....	53
Şekil 4.4: Biyoyumluluk ve biyoaktivite testi uygulanmak üzere BGD numuneleri kullanılarak hazırlanmış doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x, f) 10000x.....	54
Şekil 4.5: Biyoyumluluk ve biyoaktivite testi uygulanmak üzere BGA numuneleri kullanılarak hazırlanmış doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x, f) 10000x.....	55
Şekil 4.6: Biyoyumluluk ve biyoaktivite testi uygulanmak üzere BGDA numuneleri kullanılarak hazırlanmış doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x, f) 10000x.....	55
Şekil 4.7: 30 gün SBF’de bekletilen BG numunelerinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.....	56
Şekil 4.8: 30 gün SBF’de bekletilen BGD numunelerinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.....	57

Şekil 4.9: 30 gün SBF'de bekletilen BGA numunelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.....	57
Şekil 4.10: 30 gün SBF'de bekletilen BGDA numunelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.....	58
Şekil 4.11: Hazırlanan doku iskelelerinin EDS analizi sonuçları: a), c), d), e) biyoaktivite testi öncesi, b), d), f), h) biyoaktivite testi sonrası.	59
Şekil 4.12: Hazırlanan doku iskelelerinin biyoaktivite testi öncesi ve sonrası FT-IR grafikleri.	61
Şekil 4.13: Doku iskelelerinin biyoaktivite testi öncesi ve sonrasındaki XRD grafikleri a) BG, b) BGD, c) BGA, d) BGDA.	62
Şekil 4.14: Doku iskelelerinin L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksosite sonuçları.	64
Şekil 4.15: Doku iskelelerinin floresan mikroskop görüntüleri.	65
Şekil 4.16: L929 hücre hattı ekilmiş BG numunesinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.	66
Şekil 4.17: L929 hücre hattı ekilmiş BGD numunesinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.....	67
Şekil 4.18: L929 hücre hattı ekilmiş BGA numunesinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.....	68
Şekil 4.19: L929 hücre hattı ekilmiş BGDA numunesinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.....	69

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Kemiğin temel bileşenleri.....	7
Tablo 2.2: Bir doku iskelesinin sahip olması gereken özellikler.	13
Tablo 2.3: Farklı biyoaktif cam varyasyonları.....	23
Tablo 2.4: Biyoaktif camlardaki gelişmeler.....	24
Tablo 3.1: Hazırlanan biyoaktif cam tozlarındaki katkıları.	31
Tablo 3.2: SBF hazırlarken kullanılan kimyasallar ve miktarları.	39
Tablo 4.1: FT-IR analizlerinde kullanılan numune kodları.....	47
Tablo 4.2: BG-200 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.....	47
Tablo 4.3: BG-700 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.....	48
Tablo 4.4: BGD-200 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.....	49
Tablo 4.5: BGD-700 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.....	49
Tablo 4.6: BGA-200 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.....	50
Tablo 4.7: BGA-700 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.....	51
Tablo 4.8: BGAD-200 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.....	52
Tablo 4.9: BGDA-700 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.....	52

SEMBOL LİSTESİ

TEOS	:	Tetraetil Ortosilikat
TEP	:	Trietil Fosfat
PVA	:	Polivinil Alkol
BG	:	Biyoaktif Cam
Cl⁻	:	Klor İyonu
F⁻	:	Demir İyonu
K⁺	:	Potasyum İyonu
Sr²⁺	:	Stronsiyum İyonu
Pb²⁺	:	Kurşun İyonu
Zn²⁺	:	Çinko İyonu
Cu²⁺	:	Bakır İyonu
Fe²⁺	:	Demir İyonu
ECM	:	Ekstraselüler Matris
PBS	:	Fosfat Tamponlu Çözelti
TIPS	:	Termal Kaynaklı Faz Ayrımı Yöntemi
PBS	:	Fosfat Tamponlu Çözelti
Ca	:	Kalsiyum
P	:	Fosfor
Si	:	Silisyum
SiO₂	:	Silisyum Dioksit/Silika
Na₂O	:	Sodyum Oksit
CaO	:	Kalsiyum Oksit
P₂O₅	:	Fosfor Pentoksit
B₂O₃	:	Bor Oksit
K₂O	:	Potasyum Oksit
MgO	:	Magnezyum Oksit
FDA	:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
TRIS	:	(Hidroksimetil)-Aminometan
PP	:	Polipropilen
Al₂O₃	:	Alumina/Alüminyum Oksit
ZrO₂	:	Zirkonya
SiC	:	Silisyum Karbür
FT-IR	:	Fouirer Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
XRD	:	X-Işını Difraksiyon Spektroskopisi
SBF	:	Yapay Vücut Sıvısı
HKA	:	Hidroksikarbon Apatit
MTT	:	Hücre Canlılık Testi
L929	:	Fare Fibroblast Hücresi
HKA	:	Hidroksikarbon Apatit

ÖNSÖZ

Tüm yüksek lisans sürecimde yanımda bulunan, bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen ve ihtiyacım olan her konuda bana yardımcı olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZCAN'a ve saygıdeğer ikinci danışman hocam Prof. Dr. Cem GÖK'e çok teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmalarım boyunca laboratuvar imkanlarını bize açan Prof. Dr. Şevki ARSLAN hocamıza teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarda alanındaki bilgisiyle yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Duygu TAKANOĞLU BULUT ve Amine HAFİS ABDELSALAM'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince ilgi, alaka ve desteklerini benden esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1 Klinik Problem ve Tezin Amacı

Kemik üstün rejeneratif özelliklere sahip olan ve canlıların hayatları boyunca sürekli olarak kendisini aktif olarak modelleyen bir doku türüdür (Stevens 2008). Bu rejeneratif özellikler canlıların kemik dokusunda meydana gelen birçok doku hasarının cerrahi bir müdahaleye gerek kalmadan kendi kendine iyileşebilmesi anlamına da gelmektedir. Canlılar yaşam döngülerinin belirli zamanlarında hastalıklar, kazalar veya tamamen yaşa bağlı doğal etkenler sebebiyle bazı doku ve organlarında işlevsizlikler yaşamaya başlamaktadır. Özellikle tümörler ve ciddi kazalar vücutta dokunun kendi kendisini tedavi etmesine olanak tanımayacak derecede deformasyona sebep olmaktadır (Porter ve diğ. 2009). Her yıl birçok insan kemik hastalıkları ve doku kaybı sebebiyle cerrahi müdahaleye ihtiyaç duymaktadır ve uygun tedavi uygulanmadığında bu kişiler hayatlarını kaybedebilmektedir (Murugan ve Ramakrishna 2004). Kemiklere yapılan ortopedik cerrahi müdahalede en yaygın kullanılan yöntemler olan otogreft ve allogreft donör veya hastadan alınan bir parçanın hasarlı dokunun bulunduğu bölgeye naklidir ve tıpta bu alandaki güncel altın standart uygulamadır (Cypher ve Grossman 1996). Otogreft ve allogreft tedavilerinin dezavantajı donör bölgedeki morbidite ve bölgeden toplanabilecek greft miktarının yetersizliğidir (Baldwin ve diğ. 2019). Bu dezavantajlar kemik doku mühendisliği uygulamalarının önünü açmıştır. Kemik doku mühendisliği uygulamaları vücuttan doku alınmadan tedavi uygulanabilmesi açısından otogreft ve allogreftte bir alternatif olmuştur (Chiara ve diğ. 2012). Bu uygulamalar temel olarak biyoloji, fizik ve mühendisliğin temel ilkelerini birleştirerek bir tedavi yöntemi oluşturmayı amaçlamaktadır (Porter ve diğ. 2009, Liu ve diğ. 2019). Hasarlı dokuyu yeniden modellenmesi veya kemikteki deformasyonun onarılması için doku iskeleleri, hücreler ve büyüme faktörleri tek olarak veya toplu bir şekilde kullanılabilir (Bahraminasab ve diğ. 2021, Manzini ve diğ. 2021). Doku iskelelerinin kullanılmasındaki temel amaç bir kemiğin sahip olduğu kompleks yapıyı vücut içerisinde olabilecek en uygun şekilde simüle edip hasarlı bölgenin onarılmasını sağlamaktır. Doku hasarının tedavisinde

doku iskelelerinin kemik gelişimini arttırıcı özellikleri literatürde kabul görmüş olsa da bu yapıların geliştirilmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir. İskeleler kemik gelişimini mikro ve makro boyutta arttırıp hücrel aktiviteyi destekleyici görev görseler de bu sistemlerin vücut içerisine uygulanmasında hala zorluklarla karşılaşmaktadır (Manzini ve diğ. 2021). İskele yapılarının sahip olduğu zayıf mekanik dayanım ve tedavi bölgesinde gösterdikleri inflamatuvar etki bu zorluklardan bazılarıdır (Pereira ve diğ. 2020). Biyoaktif camlar kemik doku iskelelerinin üretiminde kullanılan biyomalzemelerden birisidir (Rahaman ve diğ. 2006). Geliştirilmesi 1960'ların sonunda olan bu malzeme günümüzde hem ortopedi hem de dental alanda aktif olarak klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Jones 2013, Cannio ve diğ. 2021). Genel olarak incelendiğinde biyoaktif malzemelerin amacı uygulandıkları bölgede tedaviyi biyolojik aktiviteyi uyarması ve bunun sonucunda dokuyla bir bağlantı sağlamaktır (Mocquot ve diğ. 2020). Günümüzde hala biyoaktif camların sahip oldukları özellikleri geliştirmek için çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle hazırlanan biyoaktif camların üretim aşamasında içerisine farklı katkıları eklenerek hazırlanan kompozit malzemelerle birçok farklı biyoaktif cam türü oluşturulmuş, orijinal 45S5 Bioglass® ile birlikte S53P4 BonAlive® ve borat tabanlı 13-93B3 biyoaktif camları ortopedi ve dişçilik alanlarında klinik testlere tabi tutulmuştur (Rahaman ve diğ. 2011, Cannio ve diğ. 2021).

Diatomit, fotosentetik ökaryotik mikroalgler olan diatomların koruyucu bir tabaka olarak oluşturdukları yapıların birikmesi ile olan doğal bir silika malzemesidir (Tamburaci ve Tihminlioglu 2017, Gönenmiş ve Özcan 2022). Sahip oldukları eşsiz morfolojik yapı ve gözeneklilikleri sebebiyle diatomlar oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (Aw ve diğ. 2012). Bu alanlara örnek olarak optik, katalizleme, filtrasyon, protein ayrımı, fotonik verilebilir (Parkinson ve Gordon 1999, Fuhrmann ve diğ. 2004, Lopez ve diğ. 2005, Losic ve diğ. 2009). Son yıllarda bu malzemelerle ilaç taşıyıcı sistemlerin ve kemik doku iskelelerinin hazırlanması üzerine de çalışmalar mevcuttur (Aw ve diğ. 2012, Mustafov ve diğ. 2020, Özcan ve diğ. 2022).

Alümina (Al_2O_3) alüminyum hidroksitin termal dehidrasyonu ile üretilmektedir (Kaur ve diğ. 2020). Karmaşık bir yapıya ve uygulanan ısı işleme bağlı olarak değişiklik gösteren farklı polimorfik fazlara sahiptir. Özellikle nano boyutta incelendiği zaman gösterdiği eşsiz biyoyumluluk ve biyomekanik özellikler

sebebiyle alümina tabanlı kompozitler, biyomedikal uygulamalarda önemli bir malzeme olmuştur (Rahmati ve Mozafari 2019). Literatürde de nano alüminanın farklı malzemelerin mekanik dayanımları üzerindeki etkisinin incelendiği ve olumlu sonuçların alındığı birçok çalışma bulunmaktadır (Li ve diğ. 2006, Parsaei ve diğ. 2023).

Bu tez çalışmasının amacı, kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere diatomit ve nano alümina ile katkılanmış nanokompozit biyoaktif cam numuneleri hazırlayıp bu katkı malzemelerinin biyoaktif camlar üzerinde etkilerinin farklı analiz yöntemleri ile incelenmesi ve buradan elde edilen sonuçların raporlanmasıdır. Çalışmada bir tanesi tamamen katkısız olmak üzere (BG) 4 farklı çeşit biyoaktif cam oluşturulmuştur. Kalan 3 numune diatomit katkılı (BGD), nano alümina katkılı (BGA) ve hem diatomit hem de nano alümina katkılı (BGDA) biyoaktif camları sol-jel yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu süreçte hazırlanmış olan biyoaktif camların analizlerinin yapılması adına polimer sünger kopyalama yöntemi ile doku iskeleleri oluşturulmuştur.

Çalışmayla alakalı literatür ve genel bilgiler, tez sürecinde yapılan çalışmalar ve deneysel sürecin optimizasyonu, hücre kültürü ve karakterizasyon sürecinde elde edilen sonuçlar, bu sonuçların yorumlanması ve tez konusuyla alakalı öneriler ilerleyen bölümlerde sunulmuştur.

1.2 Literatürdeki Çalışmalar

Herhangi bir doku veya organın kullanılamaz duruma gelmesi ciddi bir sağlık sorunudur. Tıpta yapılan gelişmeler sayesinde insan ömrü her geçen gün uzamaktadır ancak teknoloji her ne kadar gelişse de doku ve organlarda kazalar ve yaşlılıktan kaynaklı oluşan bozulmaların önüne geçilememiştir. Doku mühendisliği alanında bu soruna çözüm bulmak için her geçen gün yenilikler bulunmakta, hazırda mevcut olan biyomalzemelerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Doku mühendisliğinin bir alt dalı olan kemik doku mühendisliği alanında bu probleme yönelik birçok malzeme geliştirilmiştir. 45S5 Bioglass® 1971 yılında Hench tarafından kemikle bağ kurabilen ilk sentetik malzeme olarak raporlanmıştır (Hench 2006). Geleneksel kabul edilen ergitme yöntemiyle yapılan biyoaktif cam sentezinden

sonra sol-jel yöntemiyle biyoaktif camlar geliştirilmiş ve analizleri raporlanmıştır (Li ve diğ. 1991). Bu keşiften sonra günümüze kadar farklı yöntemlerle farklı katkı maddeleri içeren birçok biyoaktif cam türü geliştirilmiş ve analizleri yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada S70C30 olarak kodlanmış ve yaklaşık %70 SiO₂ içeren biyoaktif camlar sol-jel yöntemiyle üretilip analizleri yapılmıştır ve sonuçlar 45S5 Bioglass® ve 58S biyoaktif camının sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada malzemelere yapılmış olan FT-IR analizleri ICP analizi ile elde edilen verileri doğrulamış olup malzemelerin SBF içerisinde 3 ile 6 saat arasında apatit yapısı oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar hazırlanan S70C30 biyoaktif camının 45S5 Bioglass® ve 58S biyoaktif camı ile karşılaştırılabilir olduğunu göstermektedir (Saravanapavan ve diğ. 2003). İlerleyen süreçte sol-jel yöntemiyle üretilmiş mikro boyuttaki biyoaktif camlardan nano boyutta biyoaktif camların sentezine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada ıslak bilyalı frezeleme yöntemi ile mikro boyuttaki sol-jel biyoaktif camları yaklaşık olarak 20-70 nm arasındaki boyutlara kadar düşürülmüştür (Chen ve diğ. 2008). Biyoaktif camlar üzerinde yapılan temel çalışmalardan sonra araştırmacılar bu malzemeye farklı malzemeler katılmaya başlamış ve biyoaktif camların özelliklerini arttırmaya yönelik kompozit malzemeler oluşturmaya başlamışlardır. Başka bir çalışmada ise biyomedikal alanında kullanılmak üzere çinko ile katılanmış nano biyoaktif camlar mikro emülsiyon destekli sol-jel yöntemiyle üretilmiştir. Çalışmada yaklaşık olarak 130 nm boyutunda küre şeklinde biyoaktif cam partikülleri üretilmiştir. Çalışmadaki nano biyoaktif camların analizleri sonrasında katılan çinkonun malzeme sitotoksitesini hiçbir şekilde etkilemediği ve osteoblast hücrelerinin büyümesini desteklerken, malzemenin protein adsorpsiyon değerlerini de yükselttiği gözlemlenmiştir (Neščáková ve diğ. 2019). Benzer bir çalışmada biyoaktif camlar titanyum ve stronsiyum ile katılanmış ve kemik dokusundaki iyileştirme hızını arttırmak amaçlanmıştır. Çalışmada 58S biyoaktif camlarına katılan titanyum yüzdesi %5 ile sabit tutulmak şartıyla katılan stronsiyum miktarı kademeli olarak % mol cinsinden %0, %1, %3, %6, %9 ve %12 olarak arttırılmıştır. Çalışmanın sonunda artan stronsiyum miktarının 58S biyoaktif camlarının SBF içerisinde hidroksiapatit oluşturma hızını yavaşlattığı ancak antibakteriyal etkiyi arttırdığını gözlemlenmiştir (Moghanian ve diğ. 2021). Bu çalışmalar biyoaktif camların genel özelliklerinin farklı katkı malzemeleri ile arttırılabileceğini ve malzemelerin sahip oldukları dezavantajların etkilerinin azaltılabileceğini göstermektedir. Bu çalışmaların yanında polimer sünger kopyalama yönteminde

kullanılan polietilen ve poliüretan süngerler yerine iskele gözenekliliğini değiştirmek amacıyla farklı sünger türlerinin kullanıldığı çalışmalar da vardır. Bu çalışmalardan birisinde doğal deniz süngerleri kullanılmıştır ve sonuç yapının biyoaktivitesi ile biyomekanik özellikleri incelenmiştir. Çalışmada retikule süngerler yerine doğal süngerler kullanılması sebebiyle gözeneklilik kontrolü sağlanamamış olsa da iskeleler yapay vücut sıvısında incelendiğinde bu durumun malzeme biyoaktifliği ve biyomekanikliği üzerinde fazla etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (Boccardi ve diğ. 2016).

Biyoaktif camların yanında diatomitin ve alumina nanopartiküllerinin de sağlık alanındaki uygulamalarına yönelik çalışmalar mevcuttur.

Sonuç olarak görölmektedir ki biyoaktif camlar birçok farklı şablon malzeme kullanılarak farklı özelliklerde doku iskelelerinin üretilebileceği, farklı katkı malzemeleri ile sahip oldukları özelliklerde iyileştirmeler yapılmasına müsait, hem kemik doku mühendisliğinde hem de periodontoloji alanında umut vadeden malzemeler olup günümüzde üzerinde çalışmalar yapılıp geliştirilmeye açık malzemelerdir.

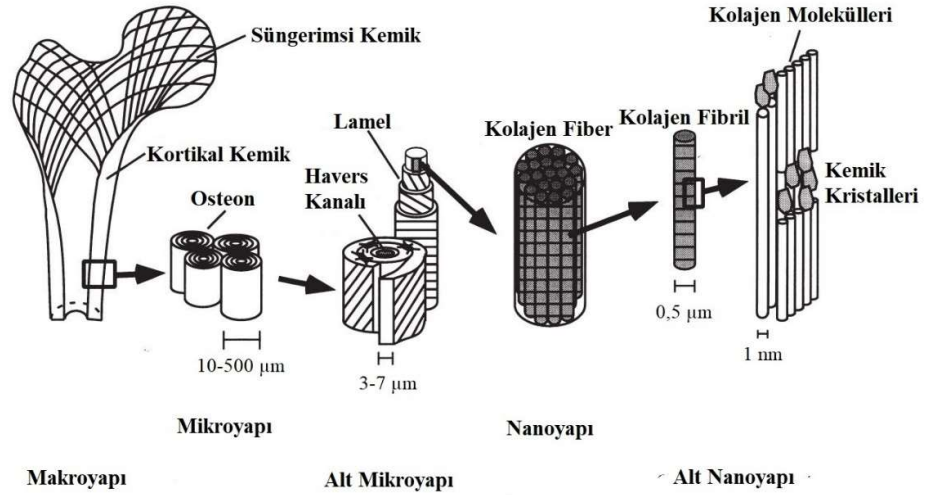
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik Doku

Kemik, canlıların yaşamları boyunca kendisini yeniden modelleyen, belirli bir şekilde organize edilmiş spesifik bir yapıya sahip olan bir bağ dokusudur (Stevens 2008). Kemik dokusunun canlı vücudunda kalsiyum ve fosfat deposu olarak görev alma, yumuşak dokuyu koruma, hareket ve desteği sağlama gibi fonksiyonları vardır (Floresio-Silva ve diğ. 2015). Vücuttaki diğer doku ve organlara göre kemik dokusunun kendini yenileyici özellikleri daha üstündür. Bu sayede hasar gören bir kemik dokusu hem morfolojik yapı hem de mekanik dayanım açısından tamamen eski haline dönebilir (Zhu ve diğ. 2021).

2.1.1 Kemik Yapısı ve Özellikleri

Vücuttaki tüm doku ve organlarda belirli bir hiyerarşik düzen mevcuttur, kemik dokusunda da aynı şekilde makro boyutlardan nano boyuta indikçe kendi içerisinde değişiklikler gösteren bir düzen vardır (Reznikov ve diğ. 2014). Kemik yapısı makroskobik boyutta gözenekliliği düşük olan kortikal kemik ve yüksek gözenekliliğe sahip olan trabeküler kemik olarak ikiye ayrılmaktadır ve vücuttaki kemik dokunun yaklaşık %80'i kortikal, kalan %20'si trabeküler kemiktir (Ott 2018). Bu iki kemik türü biyolojik olarak aynıdır ve farklılıkları mikroyapıları incelendiği zaman ortaya çıkmaktadır. Kemik yapısının makrodan nanoya doğru olan düzeni Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Kemiğin hiyerarşik yapısı (Rho ve diğ. 1998).

Kemikte heterojen bir dağılım mevcuttur ve bu yapıyı organik matrisle inorganik mineraller oluşturmaktadır (ElHawary ve diğ. 2021). Organik matris yapısı kemiğin yaklaşık %25'lik kısmını oluştururken kalan kısım kemik dokusunun sertliğini ve mekanik direncini sağlayan inorganik minerallerdir. Kemik dokunun diğer dokulara kıyasla öne çıkan karakteristik özelliği mineralize ekstraselüler matris (ECM) yapısıdır. Bu yapı spesifik bir kalsiyum fosfat minerali olan hidroksiapatit (HA)(Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) ve tip 1 kollajenden oluşmaktadır (Palmero 2016). Kemik yapısına ait genel kompozisyon Tablo 2.1'de verilmiştir, buradaki sayısal değerler farklı canlılar ve kemik türleri arasında belirli bir miktar artıp azalabilmektedir.

Tablo 2.1: Kemiğin temel bileşenleri (Palmero 2016).

Bileşen	Ağırlıkça %
Hidroksiapatit	60-70
Kollajen	10-20
Su	9-20
Kollajen olmayan proteinler	3-5
Karbonat	~4
Sodyum	~0,7
Magnezyum	~0,5
Diğer inorganik iyonlar (Cl ⁻ , F ⁻ , K ⁺ , Sr ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺)	Eser miktarda
Diğer organik maddeler (polisakkaritler, lipitler, sitokinler)	Eser miktarda

2.1.2 Kemik Doku Hücreleri ve Özellikleri

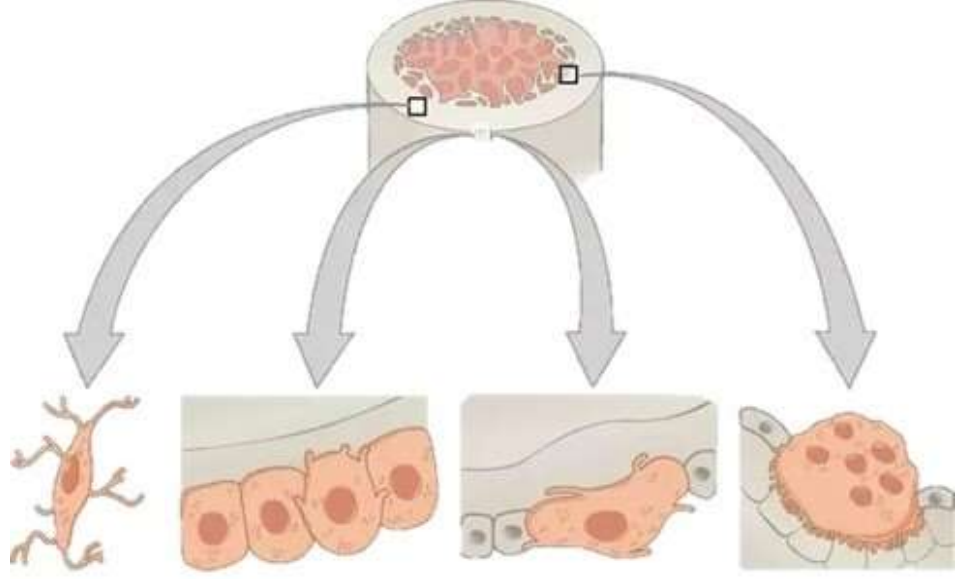
Kemik dokusunda dört çeşit hücre bulunmaktadır. Bu hücreler sırasıyla osteojenik hücreler, osteoblastlar, osteositler, ve osteoklastlardır (Fattore ve diğ. 2012).

Osteoprogenitör hücreler olarak da bilinen osteojenik hücreler kemik dokunun büyümesi ve onarımında önemli rol oynayan kök hücrelerdir (Kim ve diğ. 2020). Bu hücreler kemik iliğine bulunur ve osteoblastlarla osteositlerin öncü hücreleridir .

Osteoblastlar kemikteki protein matrisin sentezinden sorumlu yapılardır ve mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşması sonucu oluşurlar (Blair ve diğ. 2017). Osteoblastların kemik yüzeyindeki lokasyonları ve sahip oldukları yuvarlak şekil sayesinde tanımlanmaları oldukça basittir. Yetişkin hücrelerde kendi hazırladıkları matris yapıyla çevrelendikleri zaman farklılaşarak osteositleri oluştururlar (Ponzetti ve Rucci 2021).

Osteositler kemiğin oluşumunda mineralizasyona uğramamış olan matris yapıyla çevrelenmiş osteoblastlardır ve vücuttaki yetişkin kemik hücrelerinin %90'ını oluştururlar (Schaffler ve diğ. 2014). Osteoblastlardan osteositlere dönüşüm süreci yaklaşık üç gün sürer, dönüşüm süresinde hücre kendi hacminin üç katına yakın bir büyüklük hücre dışı matris üretir (Pazzaglia ve diğ. 2014). Osteositler, osteoklastları kemiğin modellenmesi gereken lokasyona yönlendirip osteoblastların ürettiği kemik matrisinin oluşumunu kontrol ederek kemik oluşumu ve yeniden modellenme sürecinde kilit rol oynarlar (Mellon ve Tanner 2012).

Osteoklastlar yaklaşık iki haftalık bir yaşam süresi olan ve eski kemiklerin rezorpsiyonundan sorumlu hücrelerdir (Salo ve diğ. 1997). Eski kemiklerin emilimi yeni kemiklerin oluşumu ve yapılandırılması için önemli bir süreçtir. Bu dört hücre türünün temsili morfolojik görüntüleri Şekil 2.2'de mevcuttur.



Şekil 2.2: Kemik doku hücreleri. Sırasıyla; osteositler, osteoblastlar, osteojenik hücreler ve osteoklastlar (Ansari ve Sheikh 2022).

2.1.3 Kemik Doku Zedelenmesi, Enflamasyon ve İyileşme Süreci

Kemikler canlıların yaşamları süresince maruz kaldıkları mekanik strese ve stres kırıklarına karşı koyabilmek için sürekli olarak bir yeniden modelleme sürecindedirler (Loi ve diğ. 2016). Kemiklerin sahip olduğu kendini iyileştirebilme kapasitesi diğer dokulara göre oldukça fazladır ve bu sebeple kemik dokusunda oluşan birçok zedelenme herhangi bir yara dokusu oluşmadan iyileşmektedir.

Kemikte iyileşme süreci primer ve sekonder olmak üzere iki çeşit iyileşme gerçekleşmektedir. Primer iyileşme nadir görülen bir durumdur ve bu süreç kemiğin yeniden modellenmesi ile benzerlik gösterir. Osteoklastlar kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirir ve yaranın bir ucundan diğerine, kan damarlarının oluşumuna izin verecek şekilde bir tünel oluşturur ve bölgede osteoblastların oluşması ile birlikte yeni kemik oluşumu başlar (Claes ve diğ. 2012). Primer iyileşme süreci inflamatuvar hücrelerden bağımsız gerçekleşmektedir ve sisteme bağlı bir inflamasyon gözlemlenmez. Sekonder iyileşme kemik doku hasarında en yaygın görülen iyileşme türüdür, inflamasyon, tamir ve yeniden modelleme olarak üç fazda incelenebilir (ElHawary ve diğ. 2021).

İnflamasyon doku zedelenmesini takiben başlar ve oluşan travma sonrası bölgedeki kan damarları yırtılarak hematoma sebep olur. Oluşan hematoma bölgede toplanan inflamatuvar hücreler ve farklı sitokin türleri için bir iskele görevi görür ve inflamasyon sürecini başlatır (Walters ve diğ. 2018). İnflamasyon süreci hasar oluştuktan 24-48 saat içerisinde pik yapar ve kırık sonrası yaklaşık bir hafta içerisinde sonlanır.

Hasar sonrasındaki tamir sürecinde ilk iki hafta hafta içerisinde birincil kallus oluşmaya başlar, eğer kemiklerin uçları birbirine değmiyorsa vücut köprü görevi görecektir yumuşak bir kallus yapısı oluşturur (Schindeler ve diğ. 2008). Bu süreçte ilk olarak tip 2 kollajenleri ardından tip 1 kollajenleri görev yapar. Burada oluşan kallus miktarı bölgenin hareketsizliğine bağlıdır (Liu ve diğ. 2010). Son olarak bölgedeki hidroksiapatit sert kemik dokusunun oluşumunu başlatır.

Kemiğin modelleme süreci aktivasyon sürecini takip eden bir rezorpsiyon veya yeniden üretim süreci olarak iki farklı aşamada gerçekleşir (Byrne ve diğ. 2011). Aktivasyon süreci modelleme sürecini başlatacaklar osteoblastlar ve osteoklastların hazırlanması ve görevlendirilmesini içerir. Aktivasyon aşamasının sonrasında osteoklastlar eski kemiklerin rezorpsiyonunu yaparken osteoblastlar da yeni kemik oluşumuna gerçekleştirir (Lemaire ve diğ. 2004).

2.2 Kemik Doku Mühendisliği

Konjenital problemler, tümörler, travmalar ve osteoporoz gibi durumlardan kaynaklanan ciddi boyutlarda kemik doku hasarları önemli tıbbi zorluklardandır (Tang ve diğ. 2016, Manzini ve diğ. 2021). Bu tarz hasarlarda kemiğin kendini iyileştirme özelliği yetersiz kalması nedeniyle cerrahi müdahale gerektirmektedir (Liu ve diğ. 2019). Günümüzde kemik dokuyla bağlantılı hasarların tedavisinde dokulara uyumlu, kemik büyümesini destekleyen immünojenik olmayan bir yöntem olan otogreft altın standart kabul edilse de sürekli olarak kemik grefti toplama ihtiyacı nedeniyle ameliyat sürecinin zorlaşması, artan kan, zaman kaybı, genel anestezi ihtiyacı ve donör bölgedeki morbidite oluşma ihtimali büyük bir endişe kaynağıdır (Schmidt 2021). Tedavi için gerekli greftin başka donörler veya kadavralardan toplandığı allogreft yöntemi otogreftin dezavantajlarını ortadan kaldırırsa da hastaya bir hastalık bulaşma

riski, olası bir bağışıklık sistemi reaksiyonu ve pahalı bir yöntem olması gibi sebepler allogreftin de uygun bir alternatif olmadığını göstermektedir (Byrne ve diğ. 2011). Bu süreçte tedavi bölgesinde polimer, metal ve seramik tabanlı implant sistemlerinin kullanılması öne çıkmış ancak bu yöntem ortopedik cerrahlar tarafından istenen kemik ve kırıldak dokunun fizyolojik özelliklerini geri kazandırmada yetersiz kalmıştır (Manzini ve diğ. 2021). Bu gelişmeler ışığında biyoloji, fizik ve mühendisliğin beraber kullanıldığı multidisipliner bir alan olan kemik doku mühendisliği uygulamaları önem kazanmaya başlamıştır (Zafar ve diğ. 2015). Kemik doku mühendisliğinin temel amacı hasar görmüş dokunun bir doku iskelesi ile yer değiştirilmesi ve hücrelerle biyolojik sinyalleri kullanarak dokuların yeniden oluşturulmasıdır (Leena ve diğ. 2017).

2.2.1 Kemik Doku İskeleleri

Kemik doku iskeleleri tedavi sürecinde bölgede mekanik destek sağlamaları ve hücre büyümesini destekleyici özelliklere sahip olmaları sebebiyle kemik doku mühendisliği için önemlidir (Hao ve diğ. 2017). Tedavi sürecinde doğal veya sentetik biyomalzemelerle üretilmiş kemik doku iskelelerine hastanın kendisinden veya bir donörden alınmış kemik hücrelerinin ekimi yapılır, kemiğin doğal koşullarını taklit eden doku iskelesi zamanla biyolojik olarak bozularak hasarlı bölgede yeni bir kemik dokusu oluşturur (Serra ve diğ. 2015).

Bugüne kadar yapılmış hiçbir malzeme kemiğin tüm özelliklerini mükemmel bir şekilde taşımamaktadır. Bu sebepler hazırlanan doku iskelelerinde farklı özelliklere sahip biyomalzemeler kullanılarak malzemelerin güçlü yanlarını taşıyan kompozitler üretilmektedir.

2.2.1.1 Doku İskelelerinde Bulunması Gereken Özellikler

Biyouyumluluk ve Biyoaktiflik: Biyouyumluluk bir bireyin vücudunda uzun bir tedavi süreci boyunca kalması planlanan malzemelerle ilgili önemli bir kavramdır (Williams 2008). Hazırlanan doku iskeleleri hücrel aktiviteyi destekleyecek şekilde tedavi bölgesinde hiçbir toksik reaksiyona sebep olmadan işlevini yerine getirebilmelidir (Chen ve diğ. 2002). Biyouyumluluk aynı zamanda doku mühendisliği

uygulamalarını allogreft ve otogreft yöntemlerinden üstün kılan özelliklerden birisidir, bunun sebebi bu iki yöntemde gerçekleşme ihtimali olan donör reddinin doku iskelelerinde gerçekleşmemesidir (Filippi ve diğ. 2020).

Biyoaktiflik, biyouyumluluğun aksine doku iskelelerinde bulunması zorunlu olmayan bir özelliktir ancak malzemenin biyoaktif olması malzemenin dokuyla direkt bağlantı yapmasını ve yüzeyde kemiksi bir apatit tabakası oluşturmasını sağlar ve bu sebeple kemik iyileşmesini hızlandırıcı bir etkisi mevcuttur (Oyane ve diğ. 2003).

Osteoindüktivite ve Osteokondüktivite: Osteoindüktiflik mekanik uyarılar veya bimoleküler yolla yeni kemik dokusunun oluşturulmasını tetikleme yeteneğidir (Velasco ve diğ. 2015).

Osteokondüktiflik malzeme yüzeyinde kemik hücrelerinin hücre dışı matriks oluşturmasını ve çoğalmasını sağlamaktadır, aynı zamanda hücrelerin yapı yoluyla bir uçtan diğerine göçünü destekler (Cornell ve Lane 1998).

Gözeneklilik, Gözenek Çapı ve Gözenek Yapısı: Hazırlanan doku iskeleleri gözenekli yapıya sahip olmalıdır. Gözeneklilik hücrelerin iskeleye daha iyi nüfuz etmesini sağlar ve iskelenin hasarlı dokunun uçları arasında bir köprü görevi görmesini sağlar. İskelenin gözenekli bir yapıya sahip olması metabolik atıkların, besinlerin ve oksijenin transferine izin verir, vaskülarizasyonu artırır (Loh ve Choong 2013). Bir kemik doku iskelesinde ideal seviyede hücre bağlanması ve doku oluşumunun gözlenmesi için gözeneklilik oranı %90'a yakın ve gözenek çapı ise 300-500 µm olmalıdır (Chen ve diğ. 2008).

Mekanik Performans: Kullanılan doku iskelesinin elastisite modülü, çekme mukavemeti, kırılma tokluğu gibi mekanik özellikleri cerrahi müdahalenin yapılacağı bölgeye mümkün olduğunca yakın olmalıdır (Mitsak ve diğ. 2012). Bu özellikler aynı zamanda malzeme biyobozunurluğu ile alakalıdır çünkü biyobozunma sürecinde malzeme oluşacak mekanik özellik değişimi kemik iyileşmesini negatif yönde etkilememelidir (Chandra ve Pandey 2020).

Biyobozunurluk: Hazırlanan doku iskeleleri kemik doku oluşumunu negatif etkilemeyecek şekilde biyolojik olarak bozunmalıdır. Biyobozunmanın kontrol edilebilecek bir oranda olması yeni doku oluşumuna olanak verecektir. İskelenin

beklenen tedavi süresinden kısa veya uzun sürede bozunması bölgedeki iyileşme sürecini negatif etkiler (Rezwan ve diğ. 2006).

Hücre Aktivasyonu: Doku iskelelerinde kullanılan malzemelerin ortamdaki hücre bağlanmasını, çoğalmasını ve kemik doku oluşum hızını pozitif yönde etkileyecek şekilde farklılaşmasını destekleyici özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Filippi ve diğ. 2020).

Ticarileşmeye Uygunluk: Ürün odaklı olarak çalışılması halinde kullanılan malzemelerin ve iskelelerin üretim sürecinin ticarileşmeye uygun olması da zorunlu olmayan ancak mühendislik kavramları açısından tercih edilmesi gereken özelliklerdir. Hazırlanan malzemenin fabrikasyonu malzeme maliyetini azaltacaktır. Pahalı malzemeler ve yöntemler gerektiren, çoklu bir şekilde üretimi yapılamayan doku iskeleleri günümüzde standart kabul edilen yöntemlere kıyasla olağanüstü bir başarı göstermedikleri takdirde tercih edilmeyecektir.

Yukarıda verilmiş olan bilgilerle birlikte başarılı bir kemik doku iskelesinden beklenen özellikler Tablo 2.2’de verilmiştir.

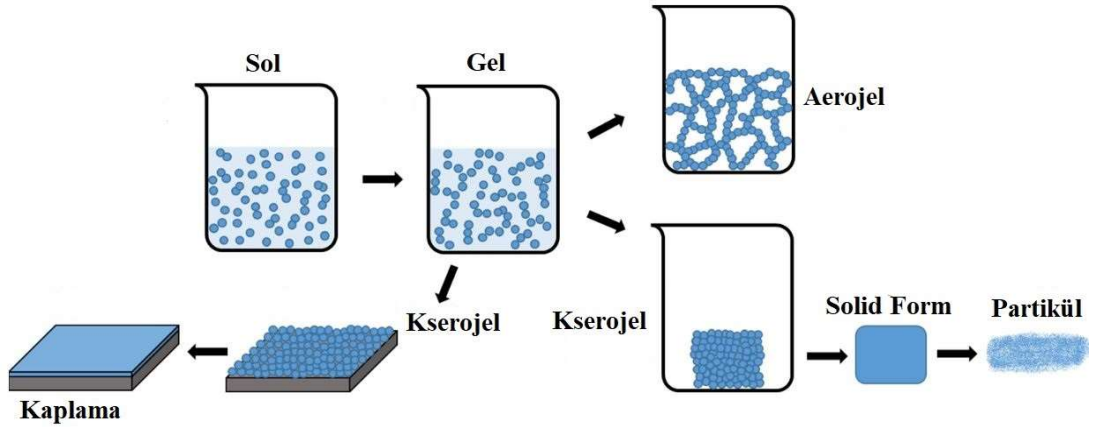
Tablo 2.2: Bir doku iskelesinin sahip olması gereken özellikler (Chen ve diğ. 2008).

İskeleden beklenen özellikler	Özelliklerin tedaviye faydaları
Biyouyumluluk	Toksik etki gözlemlenmeyen tedavi imkânı sunar
Biyoaktiflik	Kemik doku oluşumunu hızlandırır
Osteoindüktivite	Osteoblast oluşumu hızlanır, yeni kemik oluşumu tetiklenir
Osteokondüktivite	Hücreler daha iyi bağlanır ve çoğalır, kemik büyümesi desteklenir
Gözeneklilik	İskeleye daha iyi nüfuz eden hücreler, daha iyi bir doku oluşumu ve bölgeler arası substrat transferi
Mekanik Özellikler	Tedavi bölgesindeki mekanik etkilere dayanır
Biyobozunurluk	Kontrollü olması halinde tedavi süresi diğer yöntemlere göre olabilecek en iyi sürede tamamlanır
Hücre Aktivasyonu	Daha iyi hücre bağlanması, çoğalması ve farklılaşması
Ticarileşmeye Uygunluk	Çoklu üretilen ucuz malzemeler, ucuz tedavi imkânı

2.2.1.2 Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Doku mühendisliği çalışmaları süresince birçok farklı iskele üretme yöntemi bulunmuştur, her yöntemin kendine özgü avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Bu yöntemler farklı şekillerde ve belirli bir gözenek boyutuna sahip doku iskeleleri üretmek için kullanılmaktadır ancak spesifik bir lokasyona yönelik iskele üretiminde kullanım alanları sınırlıdır (Dutta ve diğ. 2017, Suamte ve diğ. 2023).

Sol-Jel Yöntemi: Sol-jel sentezi direkt olarak seramik ve cam malzemelerin üretiminde kullanılması ve köpükendirici yöntemlerle jelden direkt olarak doku iskelelerinin oluşumuna olanak tanıdığı için doku mühendisliği uygulamalarında avantajlı bir yöntemdir (Chen ve Thouas 2011). Yöntem hazırlanan bir solüsyonun reaksiyon sonucunda jel halindeki bir katı faza geçişi prensibine dayanmaktadır. Sol-jel yöntemi ve jelleşme sonrası oluşturulabilecek ürünler Şekil 2.3’de görülmektedir.



Şekil 2.3: Sol-jel yöntemi sonucunda oluşan farklı ürünler (Fernández-Hernán ve diğ. 2022).

Solvent Döküm Yöntemi: Solvent dökme yönteminde öncelikle polimer malzeme organik bir solvent içerisinde çözündürülür. Polimer-solvent çözeltisinden hazırlanan iskelenin gözenekli bir yapıya sahip olması için çözelti içerisine porojenler atılır. Çözelti homojen olana kadar karıştırıldıktan sonra çözücü liyofilizasyon veya evaporasyon yöntemleri ile ortamdan uzaklaştırılır ve geriye sadece polimer-porojen doku iskelesi kalır. Doku iskelesi porojenler üzerinde çözücü etkisi olacak fosfat tamponlu çözelti (PBS) veya su ile yıkanır. Porojenlerin ortamdan uzaklaşması ile geriye gözenekli ve polimer tabanlı bir doku iskelesi kalır.

Yöntemin avantajı hazırlanan iskelenin gözenekliliğinin ve gözenek boyutunun kullanılanlar porojen miktarı ve boyutu ile ayarlanabilen pahalı olmayan oldukça basit bir yöntem olmasıdır (Sola ve diğ. 2019). Solvent dökme yöntemi ince film tarzındaki iskelelerin üretimi için uygundur. Kalın iskelelerde porojenler her zaman ortamdan uzaklaştırılamayabilir ve kullanılan çözücüler hücrelerde sitotoksositeye sebep olabilmektedir (Tamjid ve diğ. 2020).

Termal Kaynaklı Faz Ayrımı Yöntemi (TIPS): TIPS yönteminde öncelikle kullanılan polimer çözeltisi polimerce fakir ve zengin iki farklı faz oluşturacak şekilde faz ayırımına uğrar. Yeterli polimer bulunmayan faz ortamdan uzaklaştırılırken polimer açısından zengin olan faz iskele olarak kullanılmak üzere yüksek gözeneklilik oranına sahip ağsı bir yapı oluşturacak şekilde katılaştırılır (Akbarzadeh ve Yousefi 2014).

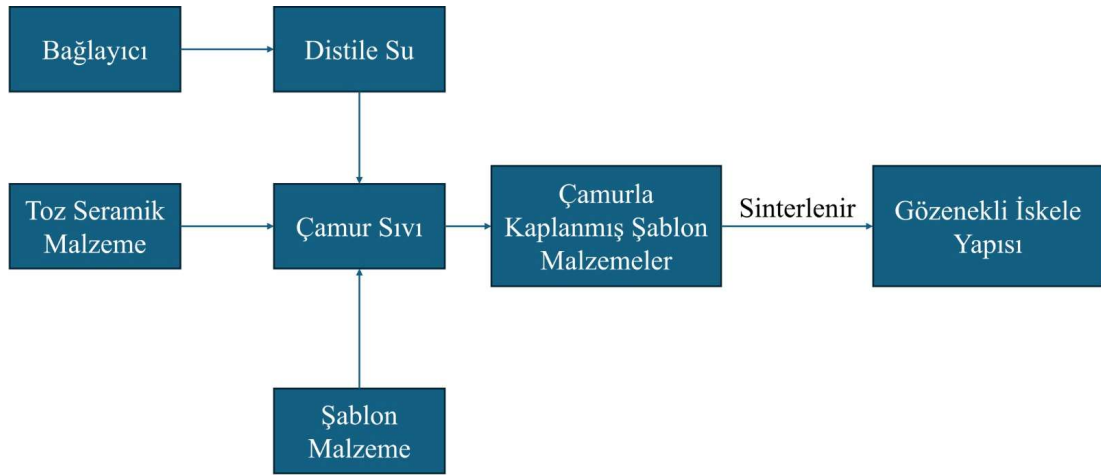
Gaz Köpüklendirme Yöntemi: Gaz köpüklendirme, ortamda yüksek basınç oluşturacak, köpüklendirici malzeme olarak inert bir gazın kullanıldığı ve önceden bir çözücü içerisinde kalıplanmış biyobozunur polimer malzemelerden yüksek gözenekliliğe sahip doku iskelelerinin üretiminde kullanılan bir yöntemdir. Yöntemde polimer malzeme gaz baloncuklarıyla dolana kadar gaz vermeye devam edilir ve sonuç olarak yaklaşık %80 ve üzeri gözenekliliğe sahip olan süngerimsi iskele yapıları oluşur (Eltom ve diğ. 2019).

Elektrospinning: Elektrospinning yüksek voltajlı bir güç kaynağı, şırınga pompası ve nanofiberleri toplamak için kullanılan metal bir plakadan oluşur. Elektrospinning yönteminde oluşacak nanofiberlerin kalitesini belirleyen birçok parametre mevcuttur. Kullanılan voltaj değeri, şırınga pompasında ayarlanan akış hızı, şırıngayla metal plaka arasındaki mesafe, ortam sıcaklığı ve hazırlanan solüsyonunu viskozitesi bu parametrelerden bazılarıdır. Nanofiber oluşumu için gerekli tüm parametreler ayarlandıktan sonra şırınga pompasında akış hızı ayarlanır ve şırınganın ucunda hazırlanan solüsyon bir damla şeklinde birikir. Ortamdaki elektrik potansiyelin artmasıyla birlikte bu damla, Taylor konisi olarak da adlandırılan bir şekil alır ve metal plakaya doğru uzamaya başlayıp metal plakada toplanmaya başlar ve nanofiberler oluşturmaya başlar. Çoklu şırıngalara, düz veya silindirik plakalara sahip farklı elektrospin sistemleri mevcuttur. Doku iskelesi uygulamalarında çoğunlukla düz bir plaka kullanılarak nanofiberler plaka yüzeyinde biriktirilir ve sonuç olarak bir doku

iskelesi oluşur. Oluşan nanofiberlerdeki mikro ve nano seviyelerinde farklı gözenekler oluşurken bu gözenek yapının kontrolü mümkün değildir.

Bu yöntemlerin yanında liyofilizasyon, polimer sünger yöntemi ve direk köpüklendirme yöntemleri de mevcuttur ancak bu yöntemler daha çok seramik veya polimer-seramik kompozit iskelelerin üretiminde kullanıldığı için ilerideki bölümlerde incelenecektir.

Polimer Sünger Yöntemi: Normalde seramik köpüklerin üretimi için kullanılmış olan bu yöntem sonraki yıllarda seramik tabanlı malzemelerle kemik doku iskelelerinin üretimi için kullanılmaya başlanmıştır. Yöntem ilk olarak 1963 yılında geliştirilmiş olsa da günümüzde hala seramik malzemelerle doku iskelelerinin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Polimer sünger yönteminde genellikle retiküle edilmiş, gözenekliliği bir şekilde kontrol edilebilen polimer tabanlı malzemeler kullanılmaktadır. Sünger kopyalama yöntemiyle doku iskelesi üretimi Şekil 2.4'da gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Sünger kopyalama yöntemi (Chen ve diğ. 2008).

Yöntemde süngerler belirli boyutlarda hazırlanır ve genellikle seramik malzemeler, bağlayıcılar ve su ile hazırlanan bir çamur sıvıya daldırılır. Daldırma sonrası hazırlanan sıvı süngere işler ve bağlayıcı sayesinde süngeri kaplar. Çamur sıvının viskozitesine bağlı olarak düzgün bir kaplama yapılması için daldırma işlemi birkaç defa tekrar edilebilir ve son olarak malzeme kurumaya bırakılır. Kurutulan doku iskeleleri polimer sünger yapının ortamdaki uzaklaştırılması için yaklaşık 450 ile 550 °C arasında ısıtılır, bu aşamada polimer malzeme ortamdaki tamamen uzaklaşır ve

geriye sadece homojen bir şekilde süngerin şeklini almış seramik malzemeden oluşan doku iskelesi kalır.

Direkt Köpüklendirme Yöntemi: Direkt köpüklendirme yönteminde sol-jel yöntemi sırasında solüsyonun içine köpüklendirici özelliğe sahip olan yüzey aktif maddeler eklenmektedir ve hızlı bir karıştırma sürecinde köpüklenen solüsyon bazı çalışmalarda direkt kullanılmış, bazılarında ise kalıplara alınarak jelleşmeye bırakılmıştır (Manavitehrani ve diğ. 2019). Yöntem sol-jel yöntemiyle seramik üretimi sonrası doku iskelesi oluşturmak için ideal bir yöntemdir. Kalıplanan köpükleştirilmiş jeller sonradan sinterlenir ve ortaya gözenekli bir kemik doku iskelesi ortaya çıkar.

Liyofilizasyon: Liyofilizasyon veya dondurarak-kurutma yöntemi homojen formdaki polimer çözeltilerinden veya seramik çamur sıvılardan kemik doku iskelelerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır (Brougham ve diğ. 2017). Yöntemde öncelikle homojen hazırlanan bir polimer çözeltisi çapraz bağlayıcı ajanla hidrojel halinde getirilmektedir. Seramik malzemelerde ise ağırlıkça seramik yoğunluğu yüksek, viskozitesi yüksek bir çamur sıvı hazırlanır. Ardından bu malzemeler dondurulur ve malzemelerdeki donmuş su süblimasyonla ortamdan uzaklaştırılır. Polimer çözeltiler için ortaya gözenekli, süngerimsi bir malzeme çıkar. Seramik tabanlı malzemeler içinse ortada kalan gözenekli yapı liyofilizasyon sonrasında sinterlenerek bir doku iskelesi oluşturulur.

2.2.1.3 Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Malzemeler

Polimerler: Polimerler sahip oldukları özellikler sebebiyle kemik doku mühendisliği dahil olmak üzere birçok alanda üzerinde çalışmalar yapılan bir malzeme türüdür. Polimerler kolay elde edilmeli, biyouyumlu olmaları, çoğunlukla alerjik bir reaksiyona sebep olmamaları ve yüksek yüzey-hacim oranları sebebiyle doku iskelelerinde hücrelerin büyümesine ve substrat transferine izin veren malzemelerdir (Suamte ve diğ. 2023). Algler, hayvanlar, mikro-organizmalar ve bitkilerden elde edilen doğal polimerler olduğu gibi sentetik olarak üretilen polimerler de mevcuttur (Asadi ve diğ. 2020). Doğal yollarla elde edilen polimerlere örnek olarak kollajen, jelatin, fibrin, elastin, kitosan, selüloz türevleri ve aljinat verilebilir. Doğal polimerlerin büyük çoğunluğu biyouyumlu ve biyobozunurdur, kolayca şekil

alabilirler ve elastik özellik gösterirler ancak bu avantajlara ek olarak sahip oldukları düşük mekanik dayanım ve yüksek sıcaklıklarda yapılarında meydana gelen hasar doku iskelesi üretiminde göz ardı edilemeyecek dezavantajlardır.

Metaller ve Alaşımlar: Demir, titanyum, paslanmaz çelik, zirkonyum ve nadir toprak elementleri gibi metaller ve bu metallerin alaşımları kullanılarak özellikle belirli bir vücut ağırlığının uygulandığı bölgelere yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Sahip oldukları bağlar sebebiyle metaller oldukça dayanıklı malzemelerdir ve özellikle mekanik dayanımın artırılmasının istendiği çalışmalarda katkı maddesi olarak tercih edilmektedirler. Bu dayanıklılığında yanında her metal biyouyumlu değildir ve vücut ortamında uğradıkları korozyon sebebiyle tedaviyi yavaşlatabilir ve bulunduğu dokuda inflamasyona sebep olabilirler.

Kompozitler: Günümüzde kullanılan hiçbir malzeme tek başına bir doku iskelesinden beklenen özellikleri tamamen taşımamaktadır. Doğası gereği sahip olduğu inorganik ve organik yapı sebebiyle kemikler de birer biyo-kompozit malzemedir. Bu yüzden araştırmacılar farklı malzemelerin güçlü yanlarını birleştirerek istedikleri spesifik özelliklere sahip, kemiğin birçok özelliğini taşıyan ve bu özellikler üzerinde pozitif etkisi olabilecek kompozit malzemeler üretmeye başlamışlardır. Hazırlanan bu inorganik-organik kompozitlere metal-metal, metal-polimer, seramik-seramik ve polimer-seramik gibi birçok örnek verilebilir.

Seramikler ve Camlar: Seramik malzemeler metal olan ve olmayan malzemelerden oluşan yapılardır. Seramikleri temelde geleneksel seramikler ve ileri teknoloji seramikler olarak incelemek mümkündür. Bunun yanında kristal ve kristal olmayan seramikler olarak da sınıflandırılabilirler. Seramikler biyouyumludurlar, yüksek aşınma ve korozyon direncine sahiptirler.

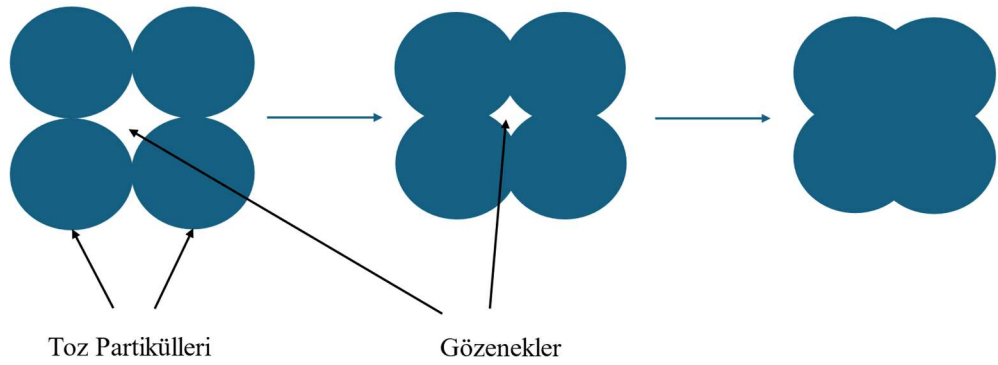
2.3 Biyoseramikler

Seramikler sahip oldukları bağlar sebebiyle yüksek termal dirence, elektriksel dirence ve sertliğe sahiptir. Aynı zamanda erime sıcaklıkları yüksek olan seramik malzemeleri eriterek şekil vermek zordur. Toz seramiklerden iskele yapılarının oluşturulması için öğütülmüş tozların belirli bir şekilde toplanması, konsolidasyonu ve

son olarak ısıtılmasıyla yapılan difüzyon ve bağlanma süreci sinterlenme olarak adlandırılır. Sinterleme süreci üç aşamadan oluşur;

- i. Tozlar birbirleriyle bağlı olacak şekilde sıkıştırılmıştır ancak fiziksel bir temas halinde değildir.
- ii. Hazırlanan sıkıştırılmış tozlar, tozların erime sıcaklığının altında kalacak bir sıcaklıkta ısıtılır. Bu aşamada tozların temas halindeki bölgelerinde bağlantı noktaları oluşur ve parçacıkların aralarındaki gözenek çapı azalmaya başlar.
- iii. Parçalar birbirleri ile tamamen bağlanır ve aralarında gözenekli bir yapı kalmaz.

Sinterleme süreci Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5: Seramik malzemelerin sinterleme süreci.

Biyoseramikler vücut ortamında veya canlı vücudunda gösterdikleri etkiye göre biyoaktif, biyoinert, biyoemilebilir seramikler olarak da sınıflandırılabilirler.

Biyoinert seramikler implant lokasyonun etrafında herhangi bir kimyasal reaksiyon göstermezler, bu tür malzemeler yüksek aşınma direncine sahiptir. Alümina (Al_2O_3) zirkonya (ZrO_2) ve silikon karbür (SiC) biyoinert malzemelere örnek verilebilir. Buna ek olarak biyoaktif ve biyoemilebilir seramiklerin içerikleri vücut ortamında kendilerine özgü bir reaksiyon gösterecekleri şekilde hazırlanmaktadır.

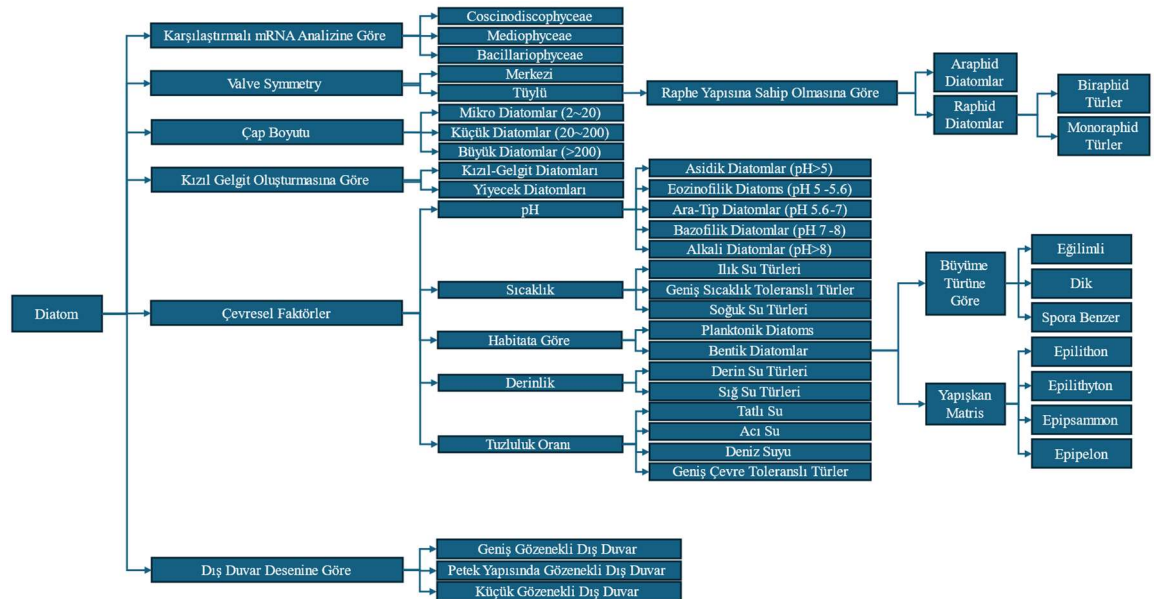
Biyoaktif seramikler iskelelerde karşılaşılabilecek yüzey kaynaklı olan bağlanma problemlerinde etkili rol oynarlar. Malzeme ile doku arasında kimyasal bir

bağ oluşturan biyoaktif seramiklere biyoaktif camlar, hidroksiapatit ve camsı seramik malzemeler örnek verilebilir.

Biyoemilebilir seramikler tedavi bölgesinde bozunmaya uğrarken iskelenin yerini yeni oluşan kemik dokusu kaplar. Kalsiyum sülfat ve trikalsiyum fosfat biyoemilebilir özellik gösterir. Biyoemilebilir iskelelerde malzemenin bozunma hızıyla kemiğin gelişim hızının birbirlerine yakın olması beklenmektedir.

2.3.1 Diatomit

Diatomit veya diatomlu toprak küçük planktonik algler olan diatomların fosilleşmesi ile oluşmuş yapılardır (Danil de Namor ve diğ. 2012). Diatomların kendilerine has hidratlı amorf silika iskelet yapıları biyosilikasyon olarak adlandırılmış bir süreçte monosilik asidin immobilizasyonu ile oluşur (Sumper ve Kröger 2004). Doğada tek veya koloniler halinde bulunabilen diatomlar Şekil 2.6’da gösterildiği gibi boyutlarına, buldukları ortamın pH’ına, sıcaklığına, habitat düzenine, derinliğine, tuzluluğuna ve frustül şekline göre birçok farklı şekilde sınıflandırılabilir. Sahip oldukları bu çeşitlilik diatomları birçok alanda kullanılabilen malzemeler haline getirmiştir. Hücre boyutları yaklaşık olarak 2-200 µm olarak değişse de 200 µm üzerinde olan büyük diatomlar da mevcuttur.



Şekil 2.6: Diatomların sınıflandırılması (Fu ve diğ. 2022).

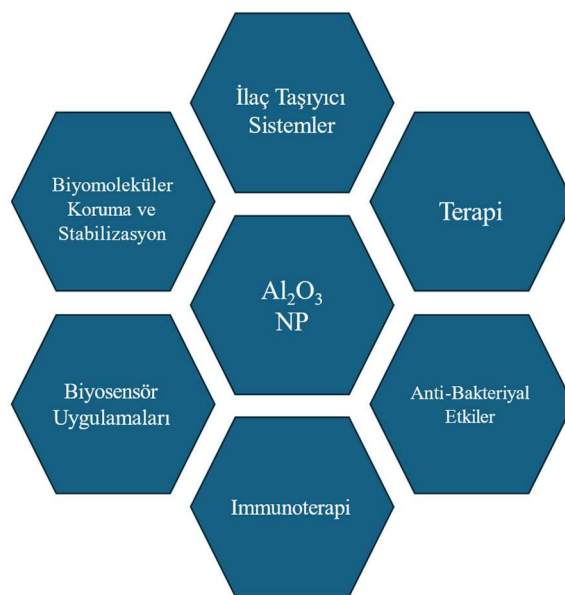
Diatomit, diatom frustüllerinin sahip olduğu gözenekli yapı ve mekanik dayanım sayesinde kimya mühendisliği, çevre mühendisliği ve inşaat mühendisliği uygulamalarında, ek olarak adsorbent ve filtre malzemesi olarak da birçok uygulamada kullanılmaktadır (Chen ve diğ. 2020). Biyosilikanın biyomedikal alandaki farklı çalışmalarda kullanılmaya başlanması bir biyosilika kaynağı olan diatom üzerinde de bu alana yönelik çalışmalar yapılmasını tetiklemiştir (Jamali ve diğ. 2012, Wang ve diğ. 2014). Diatom frustüllerinin sahip olduğu özellikler ucuz ve neredeyse sınırsız bir diatom kaynağı olan diatomitleri doku iskelesi uygulamaları için de eşsiz bir malzeme haline getirmektedir.

2.3.2 Nano Alümina

Nano alümina (Al_2O_3) veya nano alüminyum oksit gözenekli nanomalzemeler sınıfında yer alan bir seramik malzemedir.

Nano alümina sahip olduğu yüksek yüzey alanı, mekanik dayanım, ısı direnci, inert bir malzeme olması gibi özellikler sayesinde havacılık, biyomedikal ve balistik sanayisinde kullanılmaktadır (Said ve diğ. 2020).

Alumina nanopartiküllerinin biyomedikal uygulamalardaki kullanımı Şekil 2.7’te verilmiştir.



Şekil 2.7: Nano alumina tozlarının biyomedikal uygulamaları (Hassanpour ve diğ. 2018).

Alümina nanopartikülleri biyolojik ortamlarda kullanılan malzemelerin mekanik dayanımını ve aşınma direncini arttırmaktadır (Eivazzadeh-Keihan ve diğ. 2020). Alümina nanopartiküllerin kemik doku iskelelerinde kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (Zafar ve diğ. 2020). Yapılan bir çalışmada ipek fibroin ve farklı konsantrasyonlarda alümina nanopartikülleri kullanılarak solüsyonlar hazırlanmış ve hazırlanan solüsyonların liyofilizasyonu ile gözenekli ve biyobozunur doku iskeleleri oluşturulmuştur (Zafar ve diğ. 2020). Yapıya eklenen nano alümina konsantrasyonunun artmasıyla malzemenin mekanik dayanımı, gözenekliliği ve biyomineralizasyonunda artışlar gözlenmiştir. İskelelerin *in vitro* çalışmaları sonrası eklenen nano alümina miktarının toksik etkiye sebep olmadığı gözlenmiştir.

Mekanik özellikleri geliştiriciliği, hücre büyümesini destekleyen gözenek yapısı ve biyouyumluluğu nano alüminayı kemik doku iskelelerinden beklenen özellikleri artırıcı yönde etkisi olacağını göstermektedir.

2.3.3 Biyoaktif Camlar

Biyoaktif camlar 1969 yılında L. L. Hench tarafından keşfedilmiş, günümüzde farklı varyasyonları klinik olarak onaylanmış, kemik ve diş dokusuyla ilgili uygulamalarda kullanılmakta olan bir biyoseramik türüdür. Biyoaktif camlar vücut ortamına implante edilmeleri sonrasında vücut sıvılarının etkisinde kalırlar ve bu süreçte oluşturdukları, kemiğin inorganik yapısına oldukça benzeyen bir yapıya sahip hidroksikarbon apatit (HKA) tabakası ile yumuşak ve sert dokulara bağlanırlar. Bu süreçte hazırlanan ilk biyoaktif cam ergitme yöntemiyle hazırlanmış olup %45 SiO₂, %24,5 Na₂O, %24,5 CaO ve %6 P₂O₅ içermektedir ve 45S5 Bioglass® adıyla ticarileşmiştir. Malzeme yapısındaki kalsiyum (Ca), fosfor (P) ve silisyum (Si) inorganik iyonları kemik dokunun anjiyogenezi, mineralizasyonu ve büyümesinde önemli rol oynamaktadır (Hoppe ve diğ. 2011). Buna ek olarak Ca ve P kemikteki biyolojik apatit yapısının oluşmasında görev almaları sebebiyle kemik oluşumu ve rezorpsiyonu aşamalarında da yer almaktadır. Biyoaktif camların keşfinden günümüze kadar birçok farklı türü üretilmiş, üretilen bu türlerden bazıları klinik uygulamalardan geçip onaylanmış ve ticarileşmiştir. Günümüzde hala biyoaktif camlar farklı malzemelerle katkılanıp ticari biyoaktif cam türleriyle karşılaştırılmakta ve sahip

oldukları üstün özelliklerin daha iyi hale getirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu alanda üretilen, farklı miktarlarda SiO₂, Na₂O, CaO, P₂O₅ ve farklı katkı maddeleri içeren biyoaktif cam varyasyonlarından bazıları Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3: Farklı biyoaktif cam varyasyonları (Shearer ve diğ. 2023).

Biyokatif Cam	SiO₂	Na₂O	CaO	P₂O₅	B₂O₃	K₂O	MgO
45S5	45	24,5	24,5	6	-	-	-
13-93	53	6	20	4	-	12	5
13-93B3	-	6	20	4	53	12	5
S53P4	53	23	20	4	-	-	-
70S30C	70	-	30	-	-	-	-
58S	58	-	33	9	-	-	-
1-98	52,7	6	22	2	1	11	5
P50C35N15	-	9,3	19,7	71	-	-	-

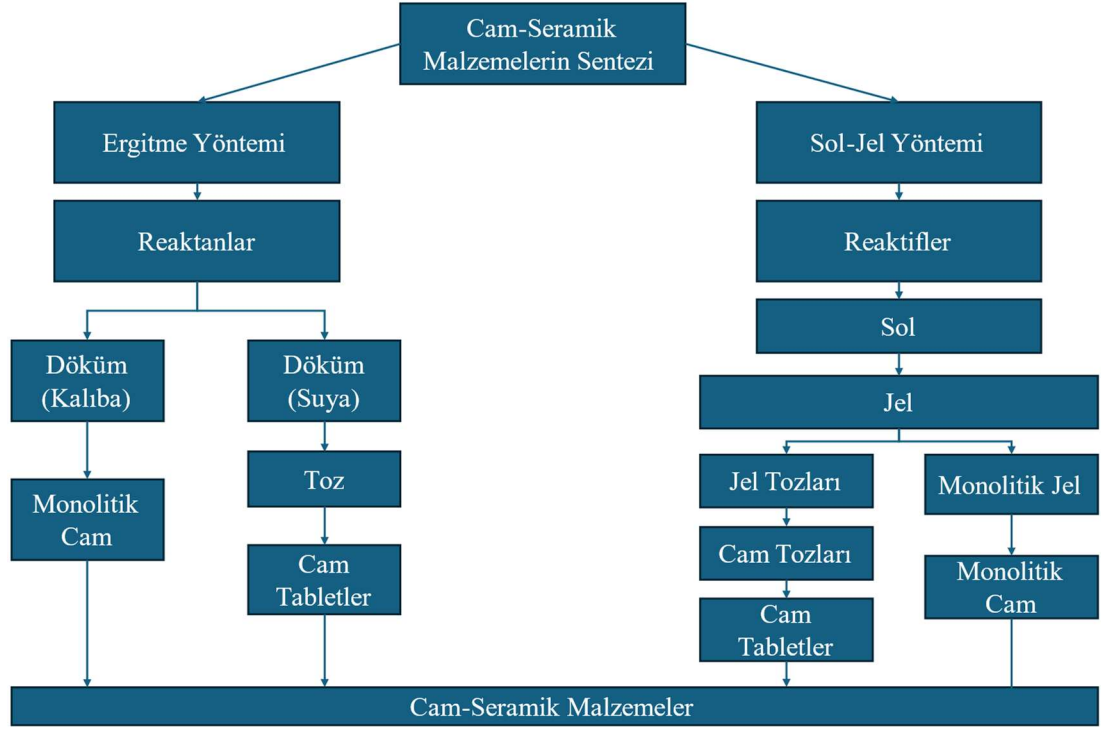
Kronolojik olarak biyoaktif camların günümüze kadar olan gelişimi ve camlarda yapılmış klinik uygulamalardan bazıları Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4: Biyoaktif camlardaki gelişmeler (Baino ve diğ. 2018).

Yıl	Malzemedeki Gelişme/Klinik Uygulama
1969	45S5 Bioglass® olarak ticarileşmiş 45S5 kompozisyonun keşfedilmesi
1977	Ceravital® cam seramiklerinin orta kulak kemiklerinin değiştirilmesi ve tedavisinde kullanılması
1978	Oküler İmplant (Malzeme kornea dokusuyla biyouyumluluk göstermiştir.)
1985	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ilk 45S5 Bioglass® implantının onaylanması. (MEP® implantının orta kulak kemikçiği onarımı için kullanımı.)
1987	Radyoaktif camlarla karaciğer kanseri tedavisi
1988	45S5 Bioglass® tabanlı hazırlanan Endosseöz Sirt İmplantının insan hastalar üzerinde klinik olarak kullanılması
1993	Diş ve kemik tedavisinde kullanılmaya başlanan 45S5 Bioglass® partikülleriyle hazırlanmış PerioGlas'ın FDA tarafından onaylanması
1998	Periferik sinir onarımı
1999	Kanser tedavisi için radyoaktif TheraSphere® biyoaktif camlarının FDA tarafından onaylanması
2000	Biyoaktif camların yara iyileşmesinde kullanılması
2002	Polyetilen ve 45S5 Bioglass® içeren gözenekli yapıya sahip kompozit bir orbital implant olan Medpor®-PlusTM'in FDA tarafından onaylanması.
2003	Zirkonyum içeren antibakteriyal kemik ve diş çimentolarının yapılması
2004	Akciğer doku mühendisliği için biyoaktif camların hazırlanması
2004	Mezogözenekli yapıya sahip biyoaktif camların ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılması
2005	Ligamentlerin ve iskelet kaslarının tedavisinde biyoaktif camların kullanımı
2005	Gastrointestinal ülser tedavisinde biyoaktif camların kullanımı
2010	Kalp doku mühendisliğinde biyoaktif camların kullanımı
2011	Borat biyoaktif camların veterinerlik alanında yara tedavisinde kullanılmak üzere ticarileştirilmesi
2012	Rahim miyomlarının embolizasyonunda biyoaktif camların kullanımı
2012	Biyoaktif camlarla omurilikteki hasarların onarılması
2018	TheraSphere® camlarının karaciğerinde metastatik kolorektal kanser olan hastaların tedavisinde kullanılması

2.3.3.1 Biyoaktif Camların Üretim Yöntemleri

Biyoaktif camlar Şekil 2.8’te gösterildiği gibi ergitme yöntemi ve sol-jel yöntemi olmak üzere iki farklı yöntemle üretilabilmektedir (Baino ve diğ. 2018).



Şekil 2.8: Biyoaktif camların üretim yöntemleri.

Ergitme yöntemiyle biyoaktif cam üretiminde kullanılan malzemeler belirli bir yüzdede hazırlanıp karıştırılıp ardından platin bir potada ergitme işlemi yapılır. Ergitme işleminde genellikle platin potalar tercih edilir, bunun sebebi malzemenin hiçbir şekilde biyoaktif camlarla reaksiyon vermemesidir. Yaklaşık 1300-1500 °C arasında eritilen karışım istenirse grafit bir kalıba dökülerek kalıplanmış biyoaktif camlar veya direk distile suya dökülüp kurutularak toz formda biyoaktif camlar üretilir.

Ergitme yöntemiyle hazırlanmış olan biyoaktif camlarda bazı sınırlamalarla karşılaşmaktadır. Camların gözeneksiz yapıya sahip olması ve biyoaktif camların yapısında kullanılan malzemelerin erime sıcaklıklarının yüksek (1300-1500 °C) olması sebebiyle bu malzemelerin özelliklerini arttırmak için katkılamak istenen çoğu malzeme bu yüksek sıcaklık değerlerinde ortamdaki uzaklaşır. Ek olarak ergitme

yöntemiyle hazırlanan biyoaktif camlarda SiO₂ değerinin %60'ın üzerine çıkması hazırlanan malzemeyi vücut sıvısı ortamında inert duruma getirir ve bu da biyoaktiflik özelliğini ortadan kaldırır (Fiume ve diğ. 2020).

Sol-jel yöntemi ergitme yönteminde karşılaşılan bu sınırlamaların birçoğunu ortadan kaldırmaktadır. Ergitme yöntemiyle hazırlanan 45S5 Bioglass® ile sol-jel yöntemiyle hazırlanan 58S biyoaktif camların karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada sol-jel yöntemiyle üretilen camların daha geniş bir yüzey alanına ve belirli bir miktar gözenekliliğe sahip olduğu, sahip olunan bu yüzey yapısı sayesinde de apatit oluşumunun 45S5 camlarına kıyasla daha hızlı olduğu gözlenmiştir (Sepulveda ve diğ. 2001).

Sol-jel yöntemiyle yapılan üretim sürecinin sonunda elde edilen ürünlerin avantajı birkaç madde ile sıralanabilir (Baino ve diğ. 2018).

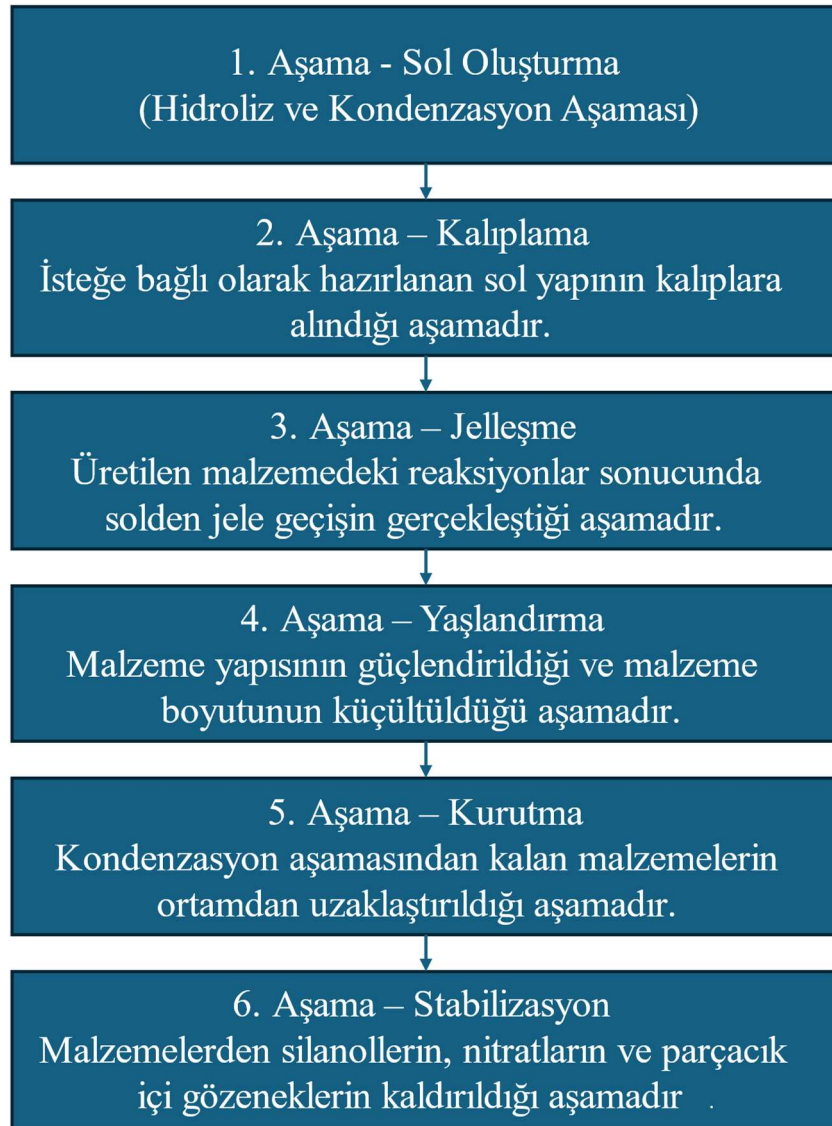
- i. Yüksek yüzey alanı sayesinde hücresel aktivite daha hızlı gerçekleşir ve vücut sıvısı ortamında malzemenin gösterdiği biyoaktiflik artış gösterir.
- ii. Daha basit kompozisyonlarla ve kompozisyonda değişiklik yapmadan farklı yapıya sahip malzeme üretimi yapılabilir.
- iii. Hazırlanan malzemeler nano-gözenekli yapıya sahip olabilir hatta nano boyutta biyoaktif camlar sentezlenebilir. Bu durumla ilgili olarak bazik ortamda küresel bir yapıya sahip nanopartiküller ve asidik ortamda mikro partiküller, monolitler ve süngerimsi biyoaktif camlar üretilebilir (Zheng ve Boccaccini 2017).
- iv. Öncül maddeler ve pH üzerinde optimizasyonlar yaparak belirli bir gözenek boyutuna sahip biyoaktif camlar oluşturmak mümkündür.
- v. Malzeme üretim sıcaklığı en fazla 700-750 °C'lere ulaşır, bu sayede ergitme yöntemiyle yapılan biyoaktif camlara katkılanması mümkün olmayan birçok farklı katkı malzemesi kullanılabilir.
- vi. SiO₂ miktarı %90'a bile çıkarılsa malzeme biyoaktifliği devam eder.

Elbette bu avantajların yanında, sol-jel yönteminin ergitme yöntemine göre zayıf kaldığı durumlar da mevcuttur. Sol-jel yöntemiyle hazırlanan malzemelerde jelin kurutulması sırasında meydana gelen çatlaklar bu yöntemle çatlaksız monolitler

oluşturmayı zorlaştırır ancak ergitme yöntemiyle hazırlanan malzemelerde bu tür problemler yaşanmaz.

Sol-jel yöntemiyle biyoaktif cam sentezinde SiO_2 kaynağı olarak Tetraetil Ortosilikat (TEOS) ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) P_2O_5 kaynağı olarak Trietil Fosfat (TEP) ($(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$), Na_2O kaynağı olarak Sodyum Nitrat (NaNO_3) ve CaO kaynağı olarak Kalsiyum Nitrat Tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) kullanılmaktadır. TEOS öncesi katalizör olarak çoğunlukla nitrik asit kullanılsa da farklı asitlerin kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur.

Sol-jel yöntemiyle biyoaktif camların sentezi Şekil 2.9'da verilmiştir.

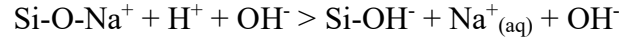


Şekil 2.9: Biyoaktif camların sol-jel yöntemiyle sentezlenmesi (Jones 2013).

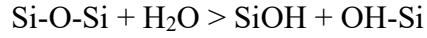
2.3.3.2 Biyoaktif Camların Çalışma Mekanizması

Biyoaktif camlar vücut sıvısı ortamında yapısal ve kimyasal değişikliğe uğrarlar. Biyoaktif camlar tarafında ortama Si ve Ca⁺² iyonlarının salınımı ve yüzeyde bir apatit tabakasının oluşması kemik dokusunun iyileşmesi ve büyümesinde kilit rol oynamaktadır. Şekil 2.10'da gösterilmiş olan biyoaktif camların çalışma mekanizması 5 adımda anlatılabilir (Rahaman ve diğ. 2011, Jones 2013).

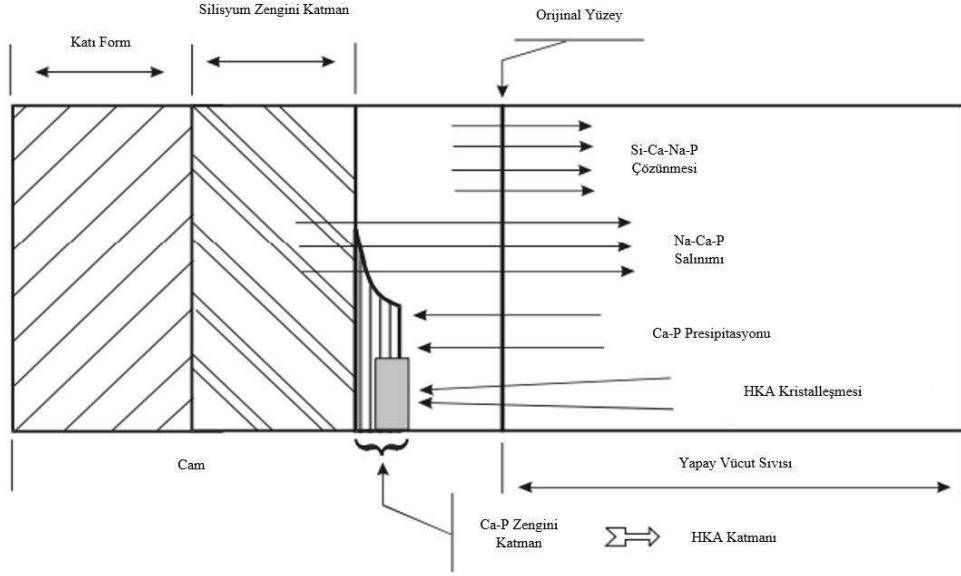
- i. Biyoaktif camın yapısında bulunan Na ve Ca iyonları ile vücut sıvısında bulunan H ve H₃O arasında silika gruplarının hidrolizine ve silanol gruplarının oluşmasına yol açan bir iyon değişimi gerçekleşir. H iyonlarının katyonlarla yer değiştirmesi sonucunda vücut sıvısının pH'ı artmaya başlar.



- ii. pH değerinin artmasıyla tetiklenen



- iii. Yüzeydeki SiO₂ açısından zengin olan yapının kondenzasyon ve re-polimerizasyon aşamaları gerçekleşir.
- iv. Biyoaktif camın çözünme süreci devam ederken camda ve vücut sıvısında mevcut olan Ca²⁺ ve (PO₄)⁻³ gruplarının SiO₂ açısından zengin gruplara transferi sonucu amorf kalsiyum fosfat (CaO-P₂O₅) tabakası oluşmaya ve büyümeye başlar.
- v. Cam yüzeyinde oluşmuş olan amorf kalsiyum fosfat çözeltideki (OH)⁻ ve (CO₃)⁻² anyonları ile bağ yaparak hidroksikarbon apatit (HKA) tabakası oluşturur.



Şekil 2.10: Biyoaktif camların çalışma mekanizması (Peitl ve diğ. 2001).

Bu aşamalar biyoaktif camların keşfedilmesiyle beraber sunulmuştur ve bu keşifi takip eden yıllarda bu aşamaların gerçekleştiğini kanıtlamak adına birçok karakterizasyon yöntemiyle testler yapılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Nitrik Asit (HNO_3), Tetraetil Ortosilikat (TEOS)($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) TCI Europe N.V. (Belçika)'den, Trietil Fosfat (TEP) ($(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$), Sigma-Aldrich (Almanya)'den, Sodyum Nitrat (NaNO_3) BeyanLab Laboratuvar Ürünleri San. Tic. Ltd. Şti. (İstanbul, Türkiye)'den, Kalsiyum Nitrat Tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) Tekkim Kimya Sanayi Tic. Ltd. Şti. (Bursa, Türkiye)'den, Diatomit Sigma-Aldrich (Almanya)'den ve Nano Alümina Tozu Nanografi (Jena, Almanya)'den. Polivinil Alkol (PVA) Akbel Kimya San. Tic. Ltd. Şti. (Bursa, Türkiye)'den satın alınmıştır.

Yapay vücut sıvısı üretiminde kullanılan Sodyum Klorür (NaCl) ISOLAB Chemicals (Eschau, Almanya)'dan, Sodyum Bikarbonat (NaHCO_3), Potasyum Klorür (KCl), Magnezyum Klorür Hekzahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Sodyum Sülfat (Na_2SO_4), Hidroklorik Asit (HCl) Tekkim Kimya Sanayi Tic. Ltd. Şti. (Bursa, Türkiye)'den, Potasyum Fosfat Dibazik Trihidrat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) Fluorochem (İngiltere)'den, Kalsiyum Klorür (CaCl_2) Merck (Almanya)'dan, Tris (hidroksimetil)-aminometan ($(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$) Carlo Erba Reagents (Fransa)'dan satın alınmıştır.

3.2 Deneysel Yöntem

Çalışmanın deneysel süreci iki aşama olarak planlanmıştır. İlk aşama 4 farklı varyasyonda biyoaktif camların sol-jel yöntemi ile sentezi ve karakterizasyonları, ikinci aşama ise hazırlanan biyoaktif camlarla sünger kopyalama yöntemini kullanarak doku iskelelerinin oluşturulması ve karakterizasyonudur. Her iki aşamanın da belirli bir deneme süreci olmuş, üretim süreçlerinde kimyasallara ve cihazlara bağlı olarak gerçekleşebilecek problemler tespit edilmiş ve deney sürecinin mümkün olan en düzgün sonucun alınacağı şekilde optimizasyonu yapılmıştır.

3.2.1 Sol-Jel Yöntemi ile Biyoaktif Camların Hazırlanması

Yapılan çalışmada SiO₂ kaynağı olarak Tetraetil Ortosilikat (TEOS) (Si(OC₂H₅)₄) P₂O₅ kaynağı olarak Trietil Fosfat (TEP) ((C₂H₅)₃PO₄), Na₂O kaynağı olarak Sodyum Nitrat (NaNO₃) ve CaO kaynağı olarak Kalsiyum Nitrat Tetrahidrat (Ca(NO₃)₂·4H₂O) kullanılmıştır. Bu süreçte, hazırlanan biyoaktif cam türleri ve bu biyoaktif camların içerdikleri katkıları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Hazırlanan biyoaktif cam tozlarındaki katkıları.

Numune Kodları	Biyoaktif Cam	Diatomit	Nano Alumina
BG	✓		
BGD	✓	✓	
BGA	✓		✓
BGDA	✓	✓	✓

3.2.1.1 BG Numunelerinin Hazırlanması

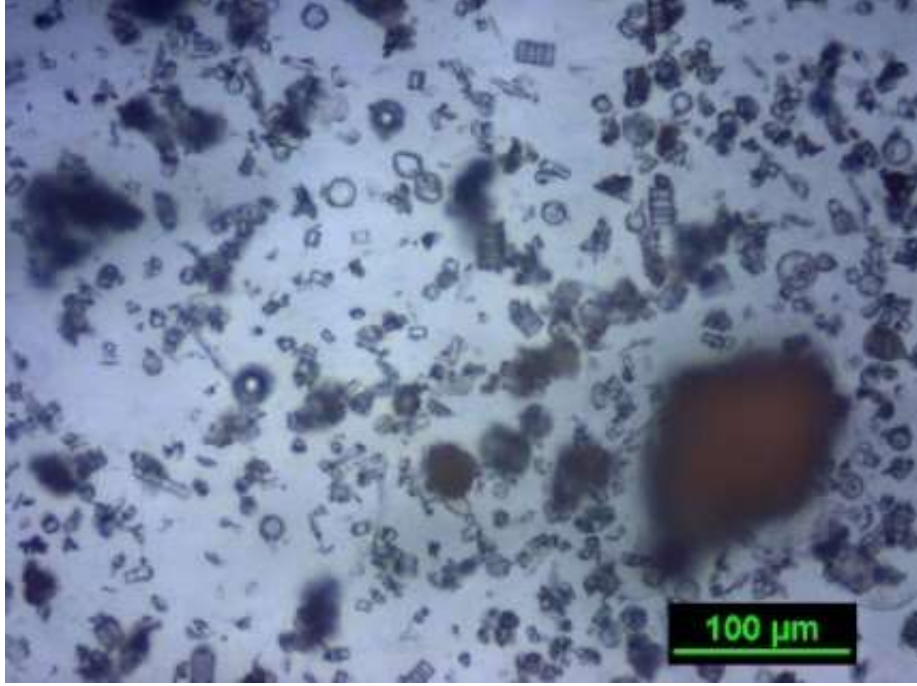
- Katalizör olarak 2M nitrik asit içeren 25 ml asidik çözelti hazırlanmış ve 25 °C’de tamamen homojen olana kadar 250 rpm’de 30 dakika karıştırılmıştır. Tüm deneysel proses boyunca eklenen her malzemenin ardından solüsyonun homojenleşmesi için ön deneme safhasında belirlenmiş olan ortalama bir miktar süre tanınmıştır.
- Homojen asidik solüsyonun içerisine 11,5 ml TEOS yavaş bir şekilde eklenmiştir. TEOS, yapısı gereği suyun üzerine çıkan bir malzeme olduğu için karıştırma hızı 600 rpm olarak ayarlanmıştır ve hazırlanan solüsyon yaklaşık 1 saat karıştırılmış. 1 saatin sonunda homojen bir solüsyon oluşmuştur.
- Solüsyona 1 ml TEP eklenmiş ve 45 dakika karışmaya bırakılmıştır.
- Son olarak solüsyona sırasıyla 7,15 g kalsiyum nitrat tetrahidrat ve 4.6 g sodyum nitrat eklenmiştir. Solüsyon tamamen homojen bir forma ulaştıktan sonra sol fazından jel fazına geçiş beklenmiştir.
- Malzemeler jel fazına geçtikten sonra 1 gün oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından ısı işlem sürecine geçilmiştir.

- vi. Isıl işlem sürecinde hazırlanan biyoaktif cam numunelerine etüvde 14 saat boyunca 60 °C’de yaşlandırma ve 5 saat 200 °C’de kurutma işlemi uygulanmıştır. Kurutma işlemi sonrası çıkan toz numuneler agat havanda öğütülmüş ve alümina kroze içerisinde 700 °C’de 3 saat daha ısıl işlem uygulanmıştır.
- vii. Hazırlanan BG numunesi partikül boyutunu düşürmek için bilyalı değirmende öğütülmüştür. Malzeme boyutunun mümkün olduğunca düşürülmesinin sebebi düşük partikül boyutlarının sinterleme sıcaklığını düşürmesidir.
- viii. Son olarak 60 °C, 200 °C ve 700 °C aşamalarında alınan toz numuneleri karakterizasyon işlemleri için ayrılmış ve kalan numuneler doku iskelesi üretiminde kullanılmıştır.

BG numuneleri hiçbir katkı içermediği için aynı zaman kontrol numunesi görevi görmektedir. Deneyin optimizasyon süreci sadece BG üretim sürecinde yapılmış, kalan süreçler yukarıda verilen maddeler aynı şekilde takip edilerek devam etmiştir.

3.2.1.2 BGD Numunelerinin Hazırlanması

DeneySEL aşamada karşılaşılabilecek sorunlar incelenip, biyoaktif cam üretimi ve sinterleme aşamaları için uygun parametreler optimize edildikten sonra katılacak diatomit üzerinde sıcaklık testleri yapılmış ve deneySEL aşama öncesinde optik mikroskop görüntüleri alınmıştır. Ardından kullanılacak olan diatomitin sinterleme aşamasından zarar görmeyeceğinden emin olunması adına diatomit içeren bir kroze 700 °C’ye ısıtılmış ve ısıl işlem sonrası diatomitler tekrardan optik mikroskop ile incelenmiştir. İnceleme sonrası diatomitin ısıl işleme herhangi bir zarar görmeden dayanabildiği gözlemlenmiştir. Oda sıcaklığı ve 700 °C için alınmış optik mikroskop görüntüleri Şekil 3.1’ye verilmiştir. Bu aşama sonrasında BGD numunelerinin hazırlanmasına geçilmiştir.



Şekil 3.1: 700 °C’de ısıl işlem görmüş diatomit ve içerdiği diatom kalıntıları.

- i. 2M nitrik asit içeren 25 ml asidik su çözeltisi hazırlanıp 25 °C’de 30 dakika karıştırılmıştır.
- ii. Solüsyona 11,5 ml TEOS eklenmiş, 1 saat 600 rpm’de karıştırılmıştır.
- iii. Solüsyona 1 ml TEP eklenmiş, dönüş hızı değiştirilmeden 45 dakika karıştırılmıştır.
- iv. Solüsyona sırasıyla 7,15 g kalsiyum nitrat tetrahidrat, 1 g diatomit, 4,6 g sodyum nitrat eklenmiş, eklenen her malzeme sonrasında solüsyonun homojen olması için 30 dakika beklenmiştir. Jelleşen solüsyon 1 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- v. Isıl işlem sürecinde BGD numuneleri yaşlandırma aşamasında 60 °C’de 12 saat ve kurutma aşamasında 200 °C’de 5 saat bekletilmiştir. Kurutulan malzemeler agat havanda öğütülmüştür ve ardından 700 °C’de 2 saat kül fırınında bekletilmiştir.
- vi. Isıl işlem sonrası numuneler bilyalı öğütücüde öğütülmüştür. 60-200 ve 700 °C’de malzemelerin bir kısmı karakterizasyon işlemleri için ayrılmış, kalanlar BGD doku iskelelerinin üretilmesinde kullanılmıştır.

3.2.1.3 BGA Numunelerinin Hazırlanması

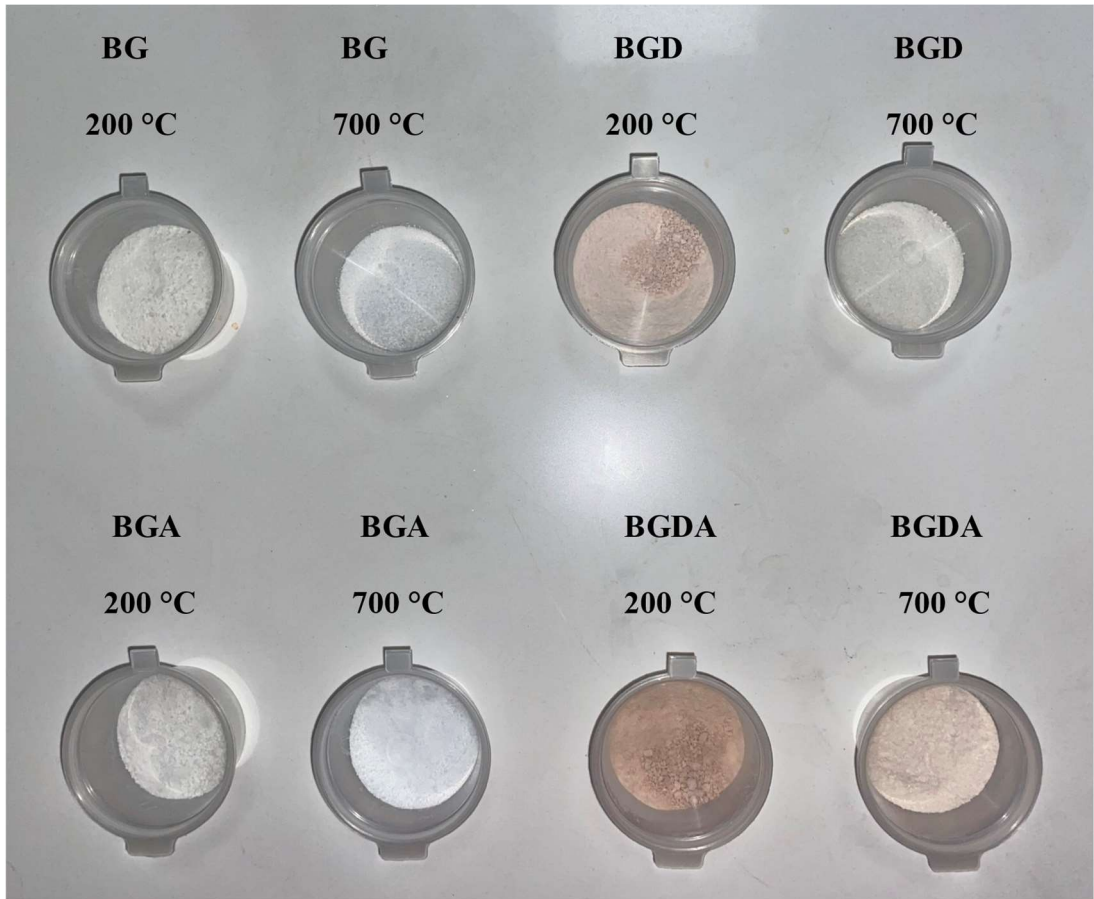
- i. 2M nitrik asit içeren 25 ml asidik su çözeltisi hazırlanıp 25 °C’de 30 dakika karıştırılmıştır.
- ii. Solüsyona 11,5 ml TEOS eklenmiş, 1 saat 600 rpm’de karıştırılmıştır.
- iii. Solüsyona 1 ml TEP eklenmiş, dönüş hızı değiştirilmeden 45 dakika karıştırılmıştır.
- iv. Solüsyona sırasıyla 7,15 g kalsiyum nitrat tetrahidrat, 1 g Al₂O₃ nanoapartikülü ve son olarak 4,6 g sodyum nitrat eklenmiştir, eklenen her malzeme sonrasında karışımın homojen forma ulaşması için 30 dakika beklenmiştir. Malzemenin jel formuna ulaşması sonrasında 1 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- v. Malzemeler ısıtılma sürecinde yaşlandırma aşaması için 60 °C’de 12 saat, kurutma aşaması için 200 °C’de 5 saat bekletilmiştir. Son olarak oluşan toz numuneler agat havan içerisinde öğütülmüş ve 700 °C’de 2 saat kül fırınında bekletilmiştir.
- vi. Isıl işlemin sonunda BGA tozları bilyalı değirmende öğütülmüştür. 60, 200 ve 700 °C’de malzemelerin bir kısmı karakterizasyon işlemi için ayrılmış, kalan toz numuneler BGA doku iskelelerinin üretiminde kullanılmıştır.

3.2.1.4 BGDA Numunelerinin Hazırlanması

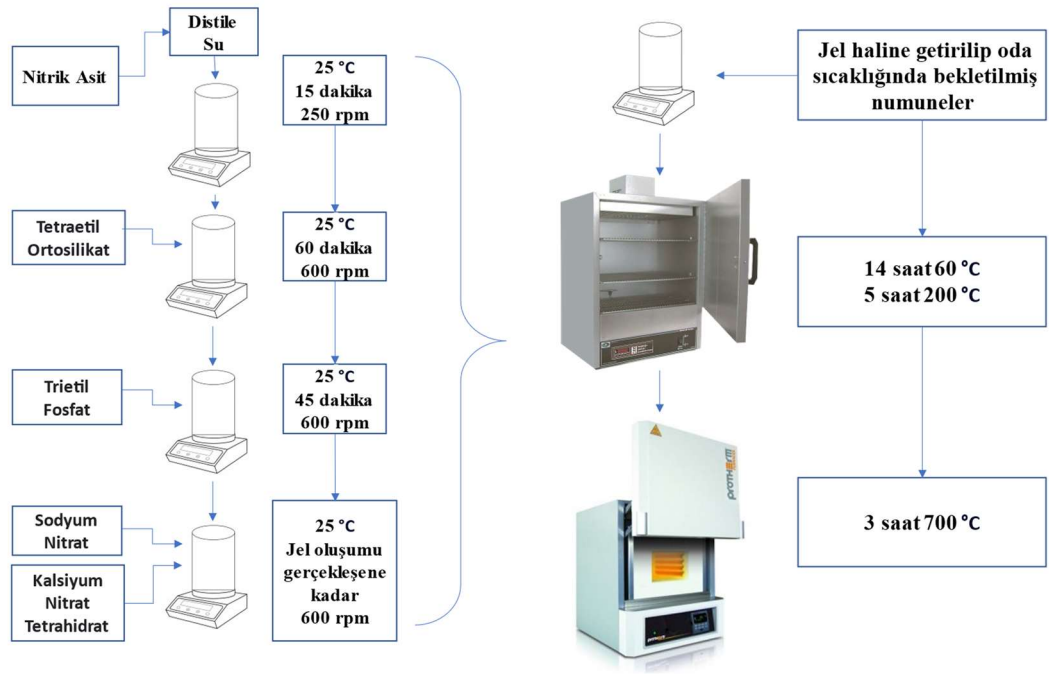
- i. 2M nitrik asit içeren 25 ml asidik su çözeltisi hazırlanıp 25 °C’de 30 dakika karıştırılmıştır.
- ii. Solüsyona 11,5 ml TEOS eklenmiş, 1 saat 600 rpm’de karıştırılmıştır.
- iii. Solüsyona 1 ml TEP eklenmiş, dönüş hızı değiştirilmeden 45 dakika karıştırılmıştır.
- iv. Homojen forma oluşan solüsyona sırasıyla 7,15 g kalsiyum nitrat tetrahidrat, 1 g diatomit, 1 g Al₂O₃ nanoapartikülü ve son olarak 4,6 g sodyum nitrat eklenmiştir, eklenen her malzeme sonrasında karışımın homojen forma ulaşması için 30 dakika beklenmiştir. Son olarak, jel formuna geçen malzeme 1 gün boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.

- v. Isıl işlem aşamasında diğer sentez süreçlerinde olduğu gibi yaşlandırma işlemi 60 °C’de 12 saat ve kurutma işlemi 200 °C’de 5 saat yapılmıştır. Numuneler agat havanda öğütülmüş ve 700 °C’de 2 saat kül fırınında bekletilmiştir.
- vi. Isıl işlem sonunda BGDA numuneleri bilyalı öğütücüde öğütülmüş, 60-200 ve 700 °C’de malzemelerin bir kısmı karakterizasyon işlemleri için ayrılmış ve kalan numuneler BGDA doku iskelelerinin üretiminde kullanılmıştır.

DeneySEL aşama sonunda üretilen tüm biyoaktif camlardan 200 °C ve 700 °C sonrasında çıkan numunelerin hepsi Şekil 3.2’te verilmiştir. Biyoaktif camların üretimine ilişkin proses Şekil 3.3’te gösterilmiştir.



Şekil 3.2: 200 °C ve 700 °C’de ısıl işlem uygulanmış BG, BGD, BGA ve BGDA numuneleri.



Şekil 3.3: Sol-jel yöntemiyle biyoaktif cam sentezinde kullanılan proses.

3.2.2 Biyoaktif Cam Numunelerinin Karakterizasyonları

Isıl işlem sonucundan biyoaktif camlarda meydana gelen kütle kaybı ve yapılarında kimyasal değişimlerin incelenmesi için malzemelerin karakterizasyonları yapılmıştır.

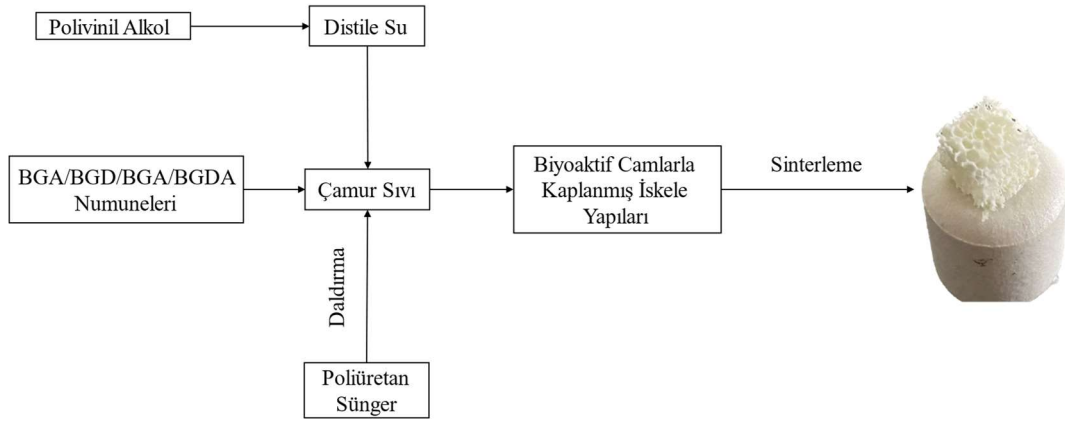
3.2.2.1 FT-IR Analizi

200 ve 700 °C’de ısıl işlem uygulanmış biyoaktif camlardan alınan numunelere malzemelerin kimyasal yapısı ve bu sıcaklık aralıklarında uğradığı değişimleri incelemek için FT-IR analizi yapılmıştır.

3.2.3 Polimer Sünger Kopyalama Yöntemiyle Kemik Doku İskelelerinin Hazırlanması

Polimer sünger kopyalama yönteminde ısıl işlem sonucu kullanılan malzemeye hiçbir şekilde zarar vermeden ortamdan uzaklaşacak şablon polimer malzemeler

kullanılmaktadır. Bu çalışmada polimer malzeme olarak retiküle edilmiş poliüretan süngerler kullanılmıştır.



Şekil 3.4: Kemik doku iskelelerinin hazırlanışı.

3.2.3.1 Doku İskelelerinin Hazırlanması

Yapılan çalışmada kullanılmış olan tüm doku iskelelerinin hazırlanışı aynı parametrelerle yapılmıştır.

- i. Kullanılan retiküle poliüretan süngerler, sünger yüzeyini hidrofilik yapmak için 30 dakika boyunca %5 (w/w) NaOH çözeltisi içerisinde bekletilmiştir.
- ii. Çalışmada kullanılan çamur sıvının içerisinde bağlayıcı olarak polivinil alkol (PVA) kullanılmıştır. Çamur sıvılarının viskozitesinin belirlenmesinde yapılan denemeler sonucunda kaplama için en uygun olan oranlar ağırlıkça %50 distile su, %45 biyoaktif cam ve %5 PVA olarak belirlenmiştir. Hazırlanan her çamur sıvı 1 saat boyunca karıştırılmıştır.
- iii. Birbirlerine eşit olacak şekilde küp şeklinde kesilen poliüretan süngerler 10 dakika boyunca sıvının içerisinde bekletilmiştir, bekleme süresinin sonunda sıvıdan çıkarılan süngerlerde bulunan fazlalıklar manuel olarak temizlenmiştir.
- iv. Hazırlanan numuneler oda sıcaklığında 12 saat boyunca kurutulmuştur.

- v. Sinterleme süreci dakikada 2 °C olacak şekilde belirlenmiştir, gereğinden hızlı ısıtılan sistemlerde iskele yapılarının çöktüğü gözlenmiştir.
- vi. Yapılar sırasıyla 0-400 °C ve 400-1100 °C olacak şekilde ısıtılmıştır. 400 °C’de numuneler 1 saat bekletilmiştir. Bu sayede iskelelerinin şablon malzemesi olarak kullanılmış olan poliüretan süngerler malzemede herhangi bir kirliliğe sebep olmadan ortamdaki uzaklaşmıştır. Doku iskelesi üretim prosesi Şekil 3.4’te özetlenmiştir.

3.2.4 Kemik Doku İskelelerinin Karakterizasyonları

SBF solüsyonunda bekletilmemiş veya hücre kültürü uygulanmamış kemik doku iskelelerine kontrol amaçlı olarak SEM ve FT-IR analizi yapılmıştır.

3.2.4.1 SEM Analizi

Kemik doku iskelelerinin yüzey morfolojisinin incelenmesi ve çalışmanın devamında iskelelere uygulanan SBF prosesi ile hücre kültürü uygulamalarında kontrol numunesi olmaları amacıyla hiçbir işlem uygulanmamış BG, BGD, BGA ve BGDA kemik doku iskelelerinin SEM görüntüleri alınmıştır.

3.2.4.2 FT-IR Analizi

1100 °C’de sinterlenmiş kemik doku iskelelerinde 200 °C ve 700 °C’ye kıyasla oluşan değişimlerin incelenmesi ve SBF prosesi sonrası meydana gelen apatit oluşumunun incelenmesi için BG, BGD, BGA ve BGDA numunelerine FT-IR analizi yapılmıştır.

3.2.4.3 XRD Analizi

Hazırlanan kemik doku iskelelerinin biyoaktivite testi öncesindeki ve sonrasındaki hallerine XRD analizi yapılmıştır. Burada elde edilen pikler incelenerek SEM görüntülerinde oluşan yapılar aydınlatılmış, biyoaktivite testi sürecinde yüzeyde oluşan apatitleşme FT-IR sonuçlarını destekleyecek şekilde incelenmiştir.

3.2.5 Kemik Doku İskelelerine Yapay Vücut Sıvısı Uygulaması

Yapay vücut sıvısının hazırlanmasında Kokubo ve arkadaşları (1990) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. SBF hazırlanırken kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: SBF hazırlarken kullanılan kimyasallar ve miktarları.

	Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar
1	Sodyum Klorür (NaCl)	7,996 g.
2	Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	0,350 g.
3	Potasyum Klorür (KCl)	0,224 g.
4	Potasyum Fosfat Dibazik Trihidrat (K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O)	0,228 g.
5	Magnezyum Klorür Hekzahidrat (MgCl ₂ .6H ₂ O)	0,305 g.
6	1M Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi	40 ml
7	Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	0,278 g.
8	Sodyum Sülfat (Na ₂ SO ₄)	0,071 g.
9	(TRIS)(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057 g.
10	1M Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi	pH 7,4’e gelecek şekilde eklenir.

Solüsyonun hazırlanmasında sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

- i. Kullanılan tüm ekipmanlar öncelikle 4 saat seyreltilmiş HCl çözeltisinde bekletilmiş ve distile su ile 3 defa temizlenmiştir.
- ii. 1 litrelik polipropilen (PP) erlen içerisine 750 ml distile su eklenmiştir ve suyun sıcaklığı 36.5-37 °C olana kadar ısıtılmıştır.

- iii. Kimyasallar sırasıyla 9 numaralı kimyasala gelene kadar erlenin içerisine eklenmiştir. Son olarak 9 numaralı kimyasal solüsyonun pH değerinde ani artış olmaması için 1'er gramlık olacak şekilde eklenmiştir.
- iv. 37 °C'de solüsyonun pH değeri ölçülmüş ve 7,5 olduğu teyit edilmiştir. 7,5 olan pH değeri 1M HCl solüsyonu kullanılarak 7,4'e ayarlanmıştır.
- v. Solüsyon sıcaklığı 20 °C'ye indikten sonra solüsyon distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon 5-10 °C'de muhafaza edilmiştir.
- vi. Solüsyonun kontrolü 50 ml SBF'nin 37 °C'de 1-2 gün boyunca tutulması ile yapılmıştır. 2. günün ardından solüsyonda çökme oluşması halinde hazırlanan solüsyon kullanılmamıştır ve yenisi hazırlanmıştır.

Hazırlanan doku iskeleleri Mikrotest MSC-30 marka çalkalayıcı su banyosunda 21 gün boyunca SBF içerisinde bekletilmiştir. Bu süreçte her 2-3 günde bir doku iskelelerinin bulunduğu SBF çözeltileri yenilenmiş, dibinde çok fazla tortu bulunan erlenler kullanım öncesi temizlenmiştir.

3.2.5.1 Yapay Vücut Sıvısı Uygulaması Sonrası SEM Analizi

İskele yüzeyindeki apatit oluşumun incelenmesi, vücut sıvısı sonucu oluşan bozunmaların ve mikroçatlakların incelenmesi için 30 gün boyunca bekletilen tüm doku iskelelerine SEM analizi yapılmıştır.

3.2.5.2 Yapay Vücut Sıvısı Uygulaması Sonrası FT-IR Analizi

SBF prosesi sonrası iskelelerle meydana gelen yapısal değişimleri incelemek adına tüm kemik doku iskelelerine FT-IR analizi yapılmıştır.

3.2.6 Doku İskelelerinin Hücre Kültürü Aşamaları

BG, BGD, BGA ve BGDA numuneleriyle hazırlanan iskelelerinin sitotoksitelerinin ve iskelelerin hücre ortamındaki etkileşimlerinin incelenmesi için tüm iskeleler hücre kültür ortamında bekletilmiştir.

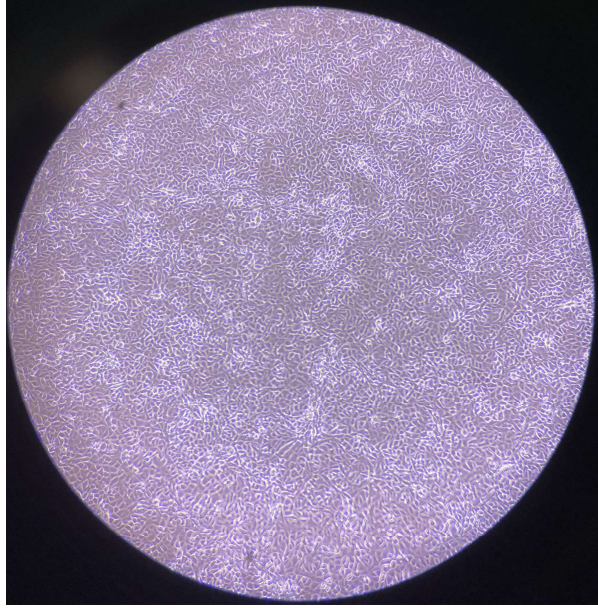
3.2.6.1 Sitotoksitite Çalışmaları için Doku iskelelerinin Hazırlığı

Yapılan çalışmada BG, BGD, BGA ve BGDA numuneleriyle hazırlanan doku iskeleleri, toksisite etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla ilk olarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi için numuneler %70'lik alkol içerisinde bekletilmiş, ardından 45 dakika UV ışık altında tutulmuştur. Daha sonra iskeleler steril falkonların içine konulmuş ve ortama eşit miktarda DMEM besiyeri ilave edilip, gece boyunca çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Bu aşamayla doku iskelelerinin besiyeri ile etkileşime girmeleri sağlanmıştır ve bu besiyerlerinden %3,125, %6,25, %12,5, %25, %37,5, %50 ve %100 konsantrasyonlarında kullanılarak sitotoksitite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.2 Hücre Kültürü ve Sitotoksitite Testi

Doku iskelelerinin sitotoksitite etkilerini incelemek için fare fibroblast hücre hattı (L929) kullanılmıştır. Hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin karışımı içeren DMEM besiyeri ortamında, 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. L929 hücreleri yaklaşık olarak %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında çalışmalarda kullanılmak üzere hücreleri tripsin enzimi ile falkonlara toplanmış ve tripan mavi boyasının yardımı ile ışık mikroskobu altında sayılmış, 96 kuyucuklu plakalara 2×10^3 ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir, hücrelerin sayım işlemi sırasındaki optik mikroskop görüntüsü Şekil 3.5'te verilmiştir.. Ardından içerisinde gece boyunca bekletilmiş doku iskeleleri olan besiyerlerin farklı konsantrasyonlar şeklinde hücreleri üzerinde muamele edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda her kuyucuğa 100 µl besiyeri ve 10 µl MTT (5mg/ml) ilave edilerek 2-4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra besiyerleri uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 50 µl dimetil sülfosit (DMSO) ilave edilmiş ve 30 dk

tekrar inkübe edilmiş ve mikropilaka okuyucusunda 590 nm’de ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Excel ve Graphpad yardımıyla değerlendirilmiştir.



Şekil 3.5: L929 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü.

3.2.6.3 Floresan Mikroskobu Çalışmaları

Doku iskelelerinin L929 hücre hatları üzerine canlı, apoptoz ve ölü hücrelerin profilini değerlendirmek için Etidyum bromür ve Akridin oranj (EB/AO) boyalarının yardımıyla floresan mikroskobu altında incelenmiştir. Daha önce sitotoksosite (MTT yöntemi) sonucunda doku iskelelerinin toksisite etki göstermeyen en yüksek konsantrasyonları (%100) seçilmiştir. 6 kuyucuklu kültür plakalarına 3×10^4 hücre ekilmiş ve gece boyunca CO₂ inkübatörde inkübe edilmiştir. Doku iskeleleri ile etkileşime giren besiyerlerinin %100 konsantrasyonlarıyla ekilen hücrelerin üzerine 24 saatlik muamele edilmiştir. Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır. Sürenin sonunda besiyerleri uzaklaştırılmış ve tripsin enzimi ile hücreleri falkonlara toplanmış ve 2000 rpm, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen peletleri 1:1 oranında fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS) ile çözülmüş ve üzerine akridin oranj ve propidyum iyodür boya karışımı ilave edilmiş 10 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Boya hücre karışı lamaların üzerine yayılmış ve lamel ile kaplanmış ve floresan mikroskobu ile incelenmiştir.

3.2.6.4 Doku İskelelerine Hücre Ekimi

Doku iskelelerin üzerine hücre hatlarının yapışıp yapışmadığını incelemek üzere %70'lik alkol ve UV ışığı ile sterilize edilmiş iskeleler 6 kuyucuklu kültür plakalarına konulmuş ve plakalara besiyerleri (DMEM) ilave edilerek 24 saat CO₂ inkübatörde bekletilmiştir. Ardından L929 hücre hatları tripsin enzimi ile toplanmış ve tripan mavi boyasının yardımı ile ışık mikroskobu altında sayılmıştır. Sayım sonrasında yaklaşık 2×10^4 adet hücre, iskelelerinin üzerine ekilmiş ve 8 gün boyunca CO₂ inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu süreçte Şekil 3.6'te görüldüğü üzere her 2-3 günde bir kuyucuklardaki besiyerleri değiştirilerek tazelenmiştir. Sekizinci günün sonunda numuneleri SEM görüntülemesi için fiksasyon ve dehidrasyon işlemlerini gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6: 6'lı kuyucuklarda besiyeri içerisinde bekletilen doku iskeleleri.

3.2.6.5 Morfolojik Analizler ve SEM Görüntülemesi

8 gün boyunca devam eden hücre kültürü uygulamasının sonunda doku iskeleleri kültür ortamından çıkarılmıştır ve her bir iskele iki defa PBS ile yıkanmıştır. L929 hücrelerinin doku iskelelerine tutunmasının SEM ile incelenmesi için doku iskeleleri fiksasyon, dehidrasyon ve kurutma aşamalarından geçirilmiştir. Fiksasyon aşaması için doku iskeleleri karanlık ortamda %2,5 (h/h) oranında hazırlanmış glutaraldehit solüsyonunda 30 dakika bekletilmiştir. Ardından %30, %50, %70, %90,

%100 (h/h) oranlarında hazırlanan etanol çözeltilerinde ikişer dakika bekletilerek dehidrasyon aşaması tamamlanmıştır. Son olarak numuneler liyofilizatörde 3 saat bekletilip kurutma aşaması tamamlanmıştır. Altın-Paladyum kaplama sonrasında numuneler SEM analizi ile görüntü alınabilecek şekilde iletken hale getirilmiştir.

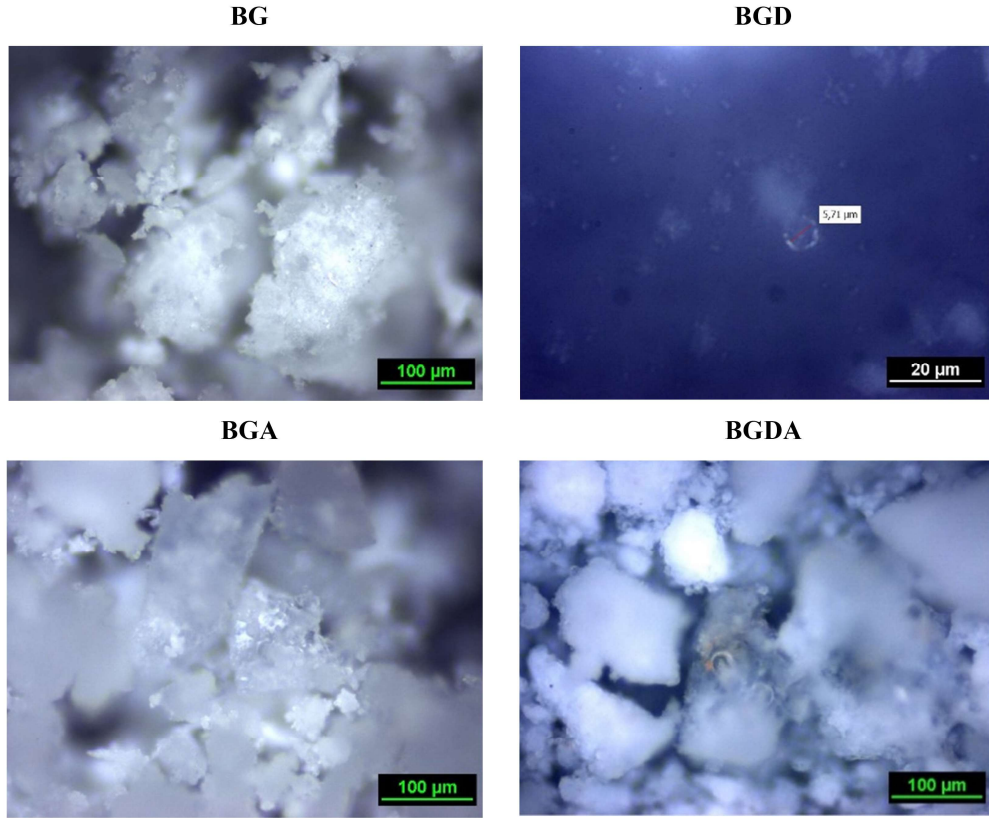
3.2.7 İstatistiksel Analiz

Çalışmanın deneyleri üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş olup elde edilen verilerin istatistiksel analizleri t-test ve One-Way ANOVA kullanılarak yapılmıştır. Standart sapma (SD_{\pm}) hesaplanmış ve *P <0,005 kabul edilmiş, Graphpad Prism V.9 ile Excel uygulamaları kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Optik Mikroskop Görüntüleri

Hazırlanan tüm biyoaktif camlar kristalleşmenin incelenmesi amacıyla ısıtma işlemi sonrası optik mikroskop altında gözlenmiştir.



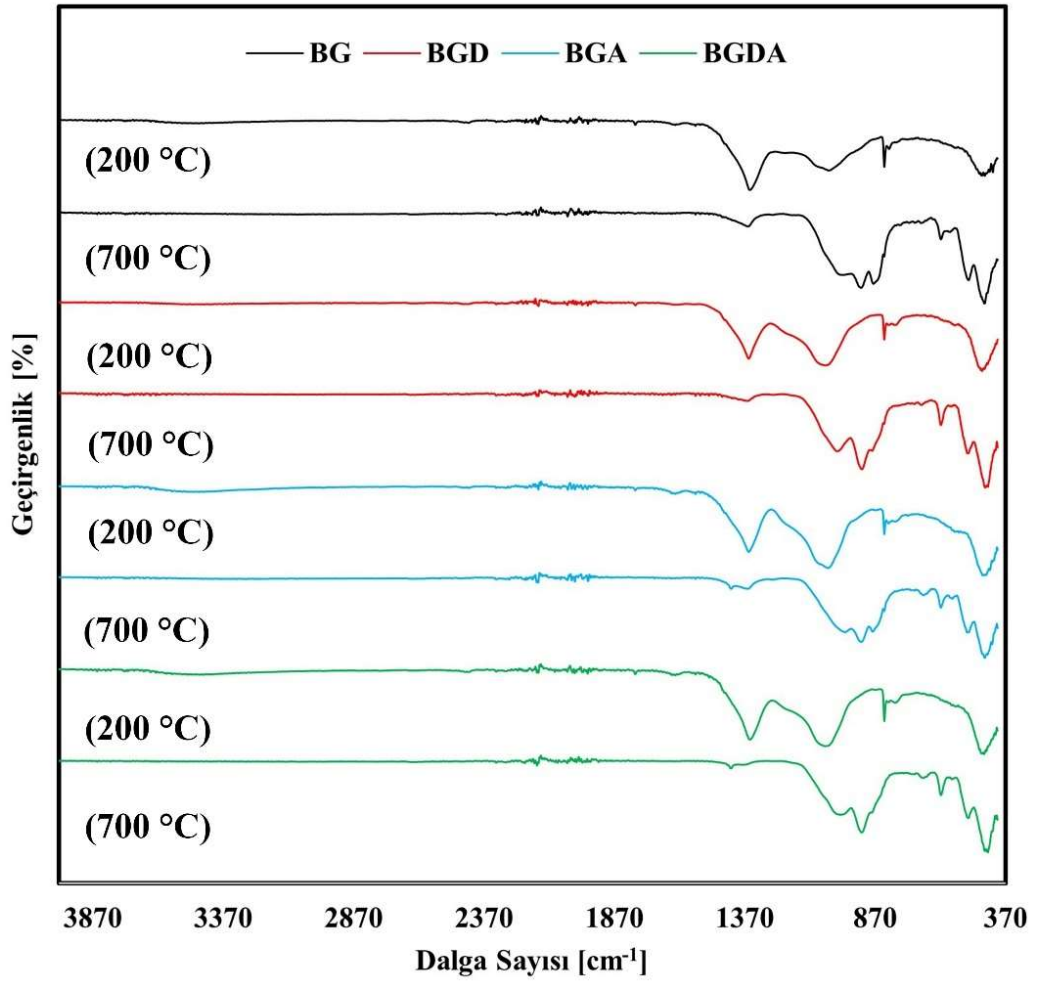
Şekil 4.1: Numunelerinin 700 °C'deki ısıtma işlemi sonrası optik mikroskop görüntüleri.

Optik mikroskop ile incelendiği zaman tüm malzemelerin kristal formdaki yapıları açık bir şekilde görülmektedir. Buna ek olarak BGD ve BGDA numunelerinde diatom kalıntıları tespit edilmiştir. Bu durum kullanılan diatomların ısıtma işlem koşullarında zarar görmediğini ve malzeme yapısına başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir. Resimler literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında zaman zaman literatürde yapılan örneklere uygun numuneler sentezlendiği görülmüştür.

4.2 Biyoaktif Cam Numunelerinin Analizleri

4.2.1 200 ve 700 derecelerdeki numunelerin FT-IR Analizi Sonuçları

BG, BGD, BGAD, BGDA numunelerinin 200 ve 700 °C'deki ısıl işlemleri sonrasında uygulanan FT-IR analizlerine ait grafikler Şekil 4.2'te verilmiştir.



Şekil 4.2: 200 ve 700 °C'deki toz biyoaktif camların FT-IR grafikleri.

Grafiklerin yorumlanma sürecinde numuneler uygulanan ısıl işlem derecesiyle uygun olacak şekilde kodlanmıştır. Bu kodlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: FT-IR analizlerinde kullanılan numune kodları.

Numune Kodları	Isıl İşlem Sıcaklığı
BG-200	200 °C
BG-700	700 °C
BGD-200	200 °C
BGD-700	700 °C
BGA-200	200 °C
BGA-700	700 °C
BGDA-200	200 °C
BGDA-700	700 °C

BG-200 numunesinin FT-IR spektrumunda 418 – 460 arasındaki pikler Si-O simetrik bükülme titreşimleridir. 500-600 cm^{-1} arasına dağılmış durumda olan piklerin P-O bağlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. 816 ve 834 cm^{-1} pikleri ise Si-OH gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 1049 cm^{-1} 'de görülen keskin pik P-O bağlarındaki gerilmeye karşılık gelen titreşimlerdir. 1350 cm^{-1} değeri ve etrafına yayılmış olan pikler N-O ve C-O gerilme titreşimine denk gelmekle birlikte malzeme yapısındaki nitratları ve adsorbe edilmiş karbonat gruplarını tanımlamaktadır. 3450 cm^{-1} BG-200 numunesine ait FT-IR pik değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2: BG-200 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.

Dalga Numarası (cm^{-1})	Fonksiyonel Grup	Titreşim Türü
~3450	O-H	Gerilme
~3450	Si-OH	Gerilme
~1350	C-O	Gerilme
~1350	N-O	Gerilme
1049	P-O	Gerilme
816-834	Si-OH	Gerilme
500-600	P-O	Gerilme
418-460	Si-O	Eğilme

BG-200 numunesinin 700 °C'ye ısıtılmasıyla elde edilmiş olan BG-700 numunesinin FT-IR spektrumu incelendiği zaman 451 cm^{-1} seviyesinde Si-O piklerinin korunduğu ve bunun yanında 511 ile 617 cm^{-1} seviyesinde keskin P-O

gerilme titreşimlerinin olduğu gözlenmektedir. Bu gerilme titreşiminin sebebi ısı işlem sonucunda yüzeyde kristalin fosfat açısından zengin bir yüzey oluşmasıdır. 876 cm^{-1} Si-O gerilme ve 1026 cm^{-1} 'de görülen pik Si-O eğilme titreşimlerini göstermektedir. Bu piklerin arasındaki keskin 923 cm^{-1} pikinin ise Si-O-Ca bağıyla alakalı olduğu düşünülmüştür. 1058 cm^{-1} bandında P-O gerilme titreşimi gözlenmektedir. 1355 cm^{-1} değerinde ciddi bir düşüş mevcuttur ve bunun sebebi ısı işlem sonucunda nitrat gruplarının ortadan uzaklaşmış olmasıdır. 1450-1600 cm^{-1} arasında yayılmış olan düşük şiddetli piklerin Si-OH gruplarındaki O-H bandının gerilmesi sebebiyle olduğu düşünülmüştür. BG-200 numunesinde olduğu gibi bu numunede de 3400-3700 aralıklarında Si-OH gruplarındaki O-H gruplarının gerilmesi kaynaklı düşük şiddetli pikler mevcuttur. BG-700 numunesine ait FT-IR spektrum değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3: BG-700 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.

Dalga Numarası (cm^{-1})	Fonksiyonel Grup	Titreşim Türü
~3400-3700	O-H	Gerilme
~3400-3700	Si-OH	Gerilme
~1450-1600	O-H	Gerilme
~1450-1600	Si-OH	Gerilme
1058	P-O	Gerilme
1026	Si-O	Eğilme
923	Si-O-Ca	Gerilme
876	Si-O	Gerilme
617	P-O	Gerilme
511	P-O	Gerilme
451	Si-O	Eğilme

BGD-200 numunesinin FT-IR spektrum sonucu incelendiğinde 420-480 cm^{-1} arasındaki Si-O eğilme titreşiminin BGB-200 ve BGB-700 numunelerine kıyasla daha yoğun olduğu görülmektedir. Buradaki diatomların sahip olduğu silikanın etkili olduğu düşünülmüştür. 790-835 cm^{-1} aralığında bir tanesi keskin olmak üzere 3 adet pik gözlenmiştir. Bu piklerin Si-O-Si simetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. 1060 cm^{-1} bandında meydana gelen pik P-O gerilme titreşimi kaynaklıdır. BG-200 numunesinde olduğu gibi BGD-200 numunesi de yapıdaki nitratları ve karbonat gruplarını temsil eden N-O ve C-O gerilme titreşimi kaynaklı 1350 cm^{-1} pikine sahiptir. 3400-3600 cm^{-1} aralığına yayılmış olan O-H gruplarının

gerilmesine bağlı olan band bu yapıda da mevcuttur. BGD-200 numunesinin spektrum değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4: BGD-200 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.

Dalga Numarası (cm ⁻¹)	Fonksiyonel Grup	Titreşim Türü
3400-3600	O-H	Gerilme
3400-3600	Si-OH	Gerilme
~1350	C-O	Gerilme
~1350	N-O	Gerilme
1060	P-O	Gerilme
790-835	Si-O-Si	Gerilme
500-600	P-O	Gerilme
459	Si-O	Eğilme

BGD-700 numunesinin FT-IR spektrum sonucu incelendiğinde 448 cm⁻¹ değerinde Si-O eğilme titreşiminin yanında 515 ve 620 cm⁻¹ değerlerinde ısııl işlem sonrasında oluşan P-O bağlarına bağlı gerilme titreşimleri kaynaklı pikler görülmektedir. 870 cm⁻¹ Si-O gerilme şiddetine bağlı bir pik mevcuttur ve 920 cm⁻¹ değerinde oluşan pikin BG-700 numunesinde olduğu gibi Si-O-Ca kaynaklı olduğu düşünölmektedir. 1014 cm⁻¹ değerinde P-O gerilme titreşimine bağlı bir pik mevcuttur. N-O gerilme titreşimi kaynaklı oluşan 1360 değerinde pik şiddetinde düşüş meydana gelmiştir ve silanol grupları kaynaklı olarak oluşan 3400-3600 cm⁻¹ aralığındaki pik bu numunede diğerlerine oranla daha düşük şiddetli olarak görülmektedir. BGD-700 numunesine ait spektrum değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.5: BGD-700 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.

Dalga Numarası (cm ⁻¹)	Fonksiyonel Grup	Titreşim Türü
~3400-3600	O-H	Gerilme
~3400-3600	Si-OH	Gerilme
1014	P-O	Eğilme
920	Si-O-Ca	Gerilme
870	Si-O	Gerilme
620	P-O	Gerilme
515	P-O	Gerilme
448	Si-O	Eğilme

BGA-200 numunesinin FT-IR sonuçları incelendiğinde 452 cm^{-1} değeri Si-O eğilme titreşimine, 512 cm^{-1} değeri ise P-O gerilme titreşimine aittir. Bu bölgede görülen 520 cm^{-1} değerinde pik ise Al_2O_3 nanopartiküllerinin karakteristik piklerinden birisi olan simetrik Al-O-Al eğilme titreşimidir (Al-Rubayee ve diğ. 2016, Kam ve diğ. 2021). Verilmiş olan bu piklerin dışında BGA numunelerinin 200 ve $700\text{ }^\circ\text{C}$ 'deki grafiklerinde BG ve BGD numunelerinden farklı bir katkı bulunsa bile piklerde çok ciddi bir değişim görülmemiştir. Literatürde Al_2O_3 nanopartiküllerin incelendiği birçok çalışma vardır. Bu çalışmalar incelendiği zaman Al_2O_3 nanopartiküllerinin genellikle $500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ değerlerinde keskin pikler, $2300\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$ aralığında ise düşük şiddetli bir pik verdiği görülmektedir (Kaur ve diğ. 2020). Buradan çıkarılacak sonuçla piklerdeki benzerliğin sebebi olarak malzeme içeriklerinin yaklaşık aynı değerlerde pik vermesi ve bu sebeple Al_2O_3 piklerinin baskılanması gösterilebilir. 818 cm^{-1} değerindeki pik Si-O gerilme titreşimi, 834 cm^{-1} değerindeki pik Al-O eğilme titreşimi olarak verilebilir. 1050 cm^{-1} değerinde P-O gerilme titreşimi ve 1354 cm^{-1} değerinde yapıdaki nitratlar sebebiyle N-O gerilme titreşimi mevcuttur. BGA-200 numunesinin 1558 ve 1636 cm^{-1} değerinde bulunan düşük şiddetli pikler ise Al-OH bandından kaynaklı gerilme şiddetleri olarak yorumlanabilir (Kam ve diğ. 2021). Diğer numunelerde bulunduğu şekilde bu numune türünde de 3450 cm^{-1} etrafından düşük şiddetli bir pik mevcuttur ve bu pikler Si-OH ile O-H gerilme titreşimlerine aittir. BGA-200 numunesine ait spektrum değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6: BGA-200 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.

Dalga Numarası (cm^{-1})	Fonksiyonel Grup	Titreşim Türü
~3450-3500	O-H	Gerilme
~3450-3500	Si-OH	Gerilme
1636	Al-OH	Eğilme
1558	Al-OH	Gerilme
1354	N-O	Gerilme
1050	P-O	Gerilme
834	Al-O	Eğilme
818	Si-O	Gerilme
520	Al-O-Al	Eğilme
512	P-O	Gerilme
452	Si-O	Eğilme

BGA-700 numunesi incelendiğinde Al_2O_3 numunelerine ait spesifik bazı piklerin daha net bir şekilde görüldüğü tespit edilmiştir. 421 ve 449 cm^{-1} değerlerinde Si-O eğilme titreşimine ait pikler görünürken 517 cm^{-1} ve 617 cm^{-1} değerlerinde P-O gerilme titreşimi tespit edilmiştir. 574 cm^{-1} değerinde görülen pik BGA-200 numunesinde de gözlenmiş olan simetrik Al-O-Al eğilme titreşimine ve 835 cm^{-1} değerinde görülen pik Al-O eğilme titreşimine aittir. 879 cm^{-1} değerinde 700 derecedeki tüm numunelerde karakteristik olarak gözlenmiş olan Si-O gerilme titreşimine, 922 cm^{-1} değerinde Si-O-Ca gerilme titreşimine ve 985 cm^{-1} değerinde P-O eğilme titreşimine ait pikler mevcuttur. BGA-700 numunesinde de 3500 cm^{-1} değerlerinde şiddeti oldukça düşük olan pikler mevcuttur ve bu pikler Si-OH ile O-H bağlarına aittir. BGA-700 numunesine ait spektrum değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7: BGA-700 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.

Dalga Numarası (cm^{-1})	Fonksiyonel Grup	Titreşim Türü
~3400-3600	O-H	Gerilme
~3400-3600	Si-OH	Gerilme
985	P-O	Eğilme
922	Si-O-Ca	Gerilme
879	Si-O	Gerilme
835	Al-O	Gerilme
617	P-O	Eğilme
574	Al-O-Al	Eğilme
517	P-O	Gerilme
449	Si-O	Eğilme
421	Si-O	Eğilme

BGAD-200 numunesinin sonuçları incelendiğinde 452 cm^{-1} değerinde Si-O, 786 cm^{-1} ve 834 cm^{-1} ’de simetrik Si-O-Si gerilme titreşimleri, 1060 cm^{-1} değerinde ise P-O gerilme titreşimi tespit edilmiştir. 200 °C’de ısıtma işlemi tamamlanan tüm numunelerde olduğu gibi BGAD-200 numunesinde de yapıda bulunan nitrat grupları sebebiyle oluşan karakteristik pik 1351 cm^{-1} ’de gözlenmiştir. BGAD-200 numunesinin yapısında da Al_2O_3 nanopartikülleri bulunması sebebiyle 1635 ve 1789 cm^{-1} ’de bulunan düşük şiddetli iki değerle sırasıyla Al-OH eğilme ve gerilme titreşimleri olduğu varsayılmaktadır. 3446 cm^{-1} değeri de Si-OH ve O-H gruplarına aittir. BGA-200 ve BGA-700 numunelerinde bulunan 550 cm^{-1} değerine yaklaşık bölgelerde bulunan Al-O-Al piki bu numunede gözlenmemiştir ancak bu değer

etrafında düşük şiddetli pikler mevcuttur. Buradan yapıda bulunan diatom sebebiyle oluşan yüksek şiddetli piklerin Al_2O_3 nanopartiküllerine ait pikleri baskıladığı varsayılabilir. BGAD-200 numunesine ait spektrum değerleri Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.8: BGAD-200 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.

Dalga Numarası (cm^{-1})	Fonksiyonel Grup	Titreşim Türü
~3400-3500	O-H	Gerilme
~3400-3500	Si-OH	Gerilme
1789	Al-OH	Gerilme
1635	Al-OH	Eğilme
1351	N-O	Gerilme
1060	P-O	Gerilme
834	Si-O-Si	Gerilme
786	Si-O-Si	Gerilme
452	Si-O	Eğilme

BGAD-700 numunesinin sonuçlarında da BGAD-200’e benzer şekilde Al_2O_3 ’ün bazı karakteristik pikleri çok düşük şiddetlerde gözlenmiştir. Bununla birlikte biyoaktif cam yapısı gereği oluşan pikler sorunsuz bir şekilde gözlenmiştir. 418 cm^{-1} ve 437 cm^{-1} Si-O eğilme titreşimlerini, 512 cm^{-1} değerinde P-O gerilme titreşimi, 578 cm^{-1} değerinde simetrik Al-O-Al eğilme titreşimi, 617 cm^{-1} P-O eğilme titreşimini göstermektedir. 922 cm^{-1} Si-O-Ca gerilme titreşimine, 1004 cm^{-1} P-O gerilme titreşimine aittir. 1423 cm^{-1} değerindeki düşük şiddetli pik, BGAD-200 numunelerinde bulunan ve ısı işlem sonucu ortamdaki uzaklaşan nitrat gruplarını göstermektedir. 3400-3600 aralığında Si-OH ve O-H gruplarına ait pikler geniş bir aralığa yayılmıştır. BGAD-700 numunesine ait spektrum değerleri Tablo 4.9’da verilmiştir.

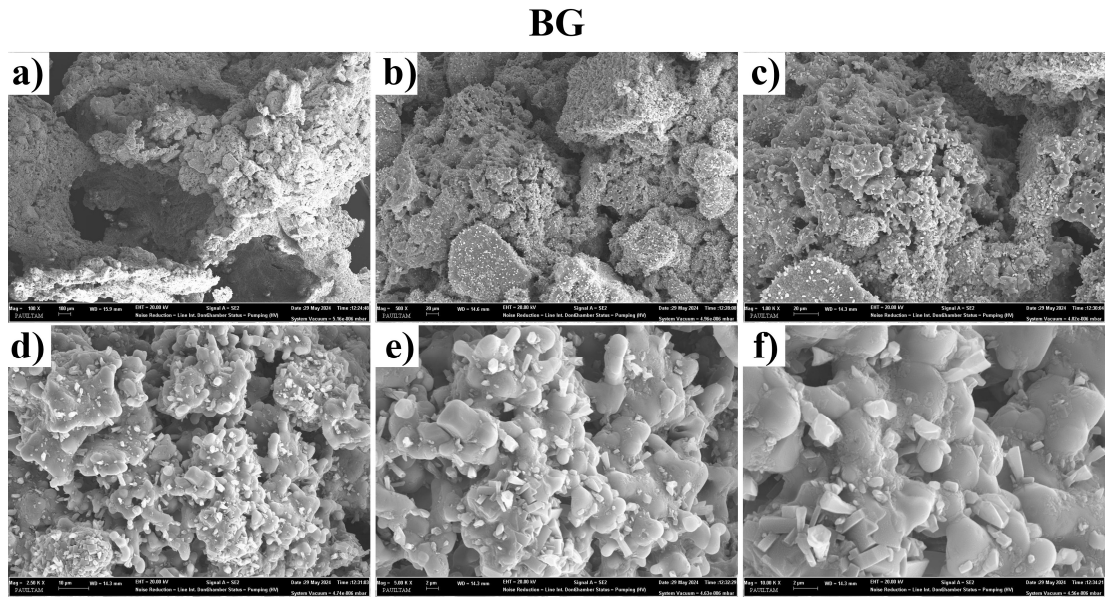
Tablo 4.9: BGDA-700 numunesinin FT-IR spektrum değerleri.

Dalga Numarası (cm^{-1})	Fonksiyonel Grup	Titreşim Türü
~3400-3600	O-H	Gerilme
~3400-3600	Si-OH	Gerilme
1004	P-O	Eğilme
922	Si-O-Ca	Gerilme
617	P-O	Eğilme
578	Al-O-Al	Eğilme
512	P-O	Gerilme
437	Si-O	Eğilme
418	Si-O	Eğilme

4.3 Biyoaktivite Testi Yapılmış Numunelerin Analiz Sonuçları

4.3.1 SEM/EDS Analizi

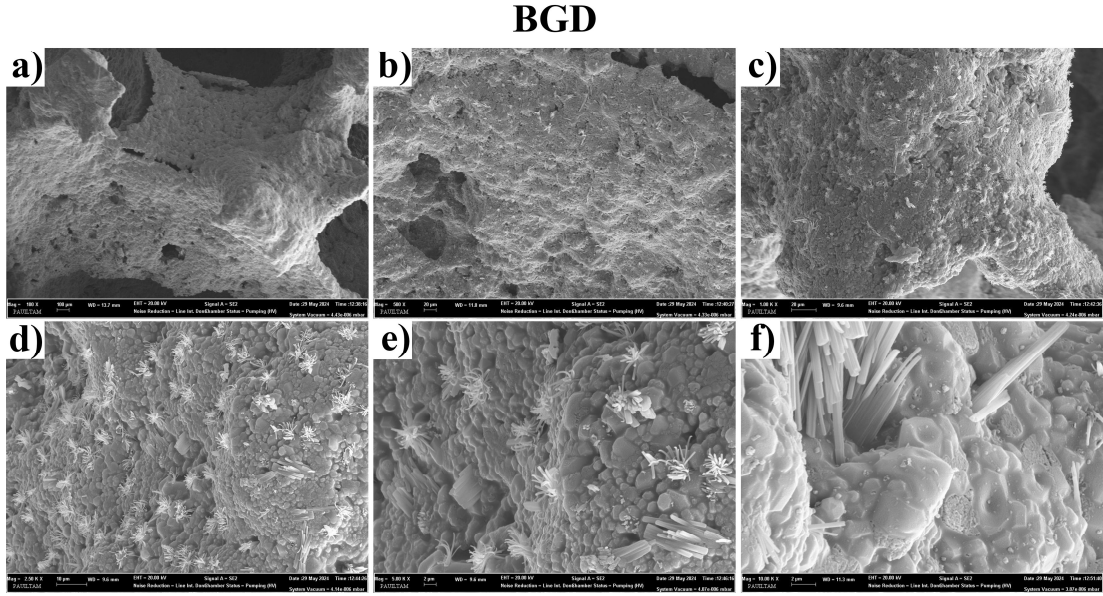
BG, BGD, BGA ve BGDA numuneleri kullanılarak hem biyoyumluluk hem de biyoaktivite testlerinde kullanılmak üzere doku iskeleleri üretilmiştir. Hazırlanan doku iskelelerinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6’da verilmiştir. Doku iskelelerinin hiçbirisinde kullanılan şablon malzemeye ait kalıntıya rastlanmamıştır ve kullanılan süngerin yapısına benzeyen, ince ve kalın olacak şekilde farklı gözenekler içeren makroyapıların oluştuğu gözlenmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde tüm numunelerde biyoaktif cam kaplamanın oldukça homojen bir şekilde dağıldığı ve gözeneklerde tıkanıklıklarının bulunmadığı görülmüştür. Oluşan bu makroyapılar kemik oluşumunu destekleyici morfolojik özellikler göstermektedir. Tüm doku iskelelerinin yüzeylerinde yapıya homojen şekilde dağılmış Ca-P kristalleri mevcuttur.



Şekil 4.3: Biyoyumluluk ve biyoaktivite testi uygulanmak üzere BG numuneleri kullanılarak hazırlanmış doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x, f) 10000x.

BG numunesi kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin farklı büyütme oranlarında SEM görüntüsü Şekil 4.3’te verilmiştir. Doku iskelesinin yüzeyinde ısıtma işlemi sonucu oluşan kristalleşmenin homojen bir şekilde yüzeye dağıldığı

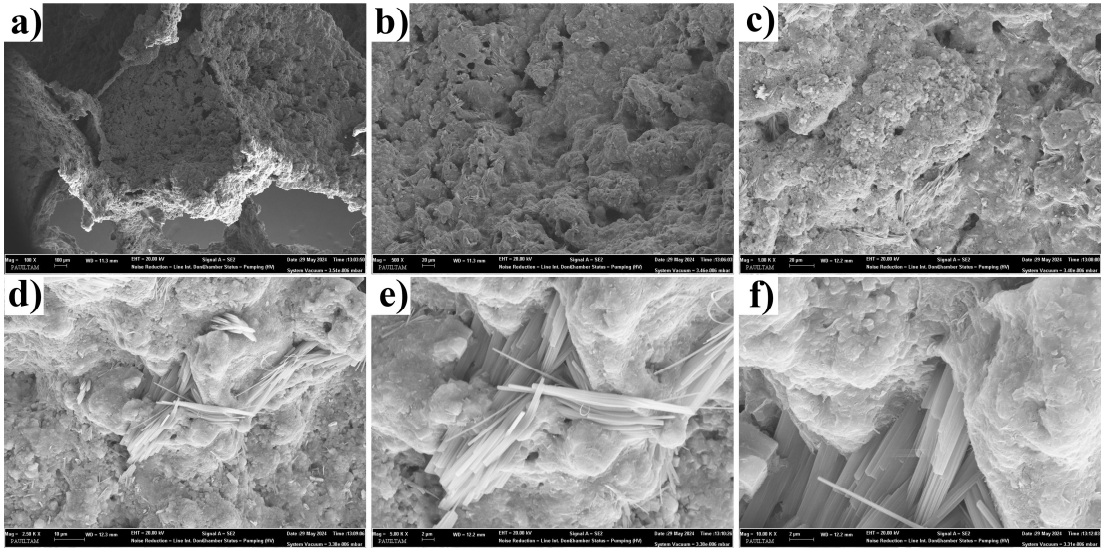
görülmektedir. Yüzeyde parça parça görülen kristal yapıların uygulanan ısıl işlem süresinden kaynaklandığı ve amorf ile kristal yapıları birlikte içeren bir iskele yüzeyi oluştuğu söylenebilir. Toz numunelerin FT-IR sonuçları da incelendiğinde bu yüzey yapısında farklı fazlarda silika ve Ca-P içeren yapıların mevcut olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4: Biyouyumluluk ve biyoaktivite testi uygulanmak üzere BGD numuneleri kullanarak hazırlanmış doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x, f) 10000x.

BGD numuneleri incelendiğinde yüzeydeki kristallerin ısıl işlem süreciyle bağlantılı olarak yumuşamaya başladığı görülmüştür. Bu kristallerin oluşmasının aynı zamanda diatomitin eser miktarda içerdiği farklı minerallerden kaynaklı olduğu da söylenebilir. Malzeme yüzeyi boyunca diatom frustüllerinin genişmesiyle oluşan gözenekli yapılar homojen bir şekilde dağılmıştır, bu yapıları farklı büyütme oranlarıyla gösteren SEM görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir.

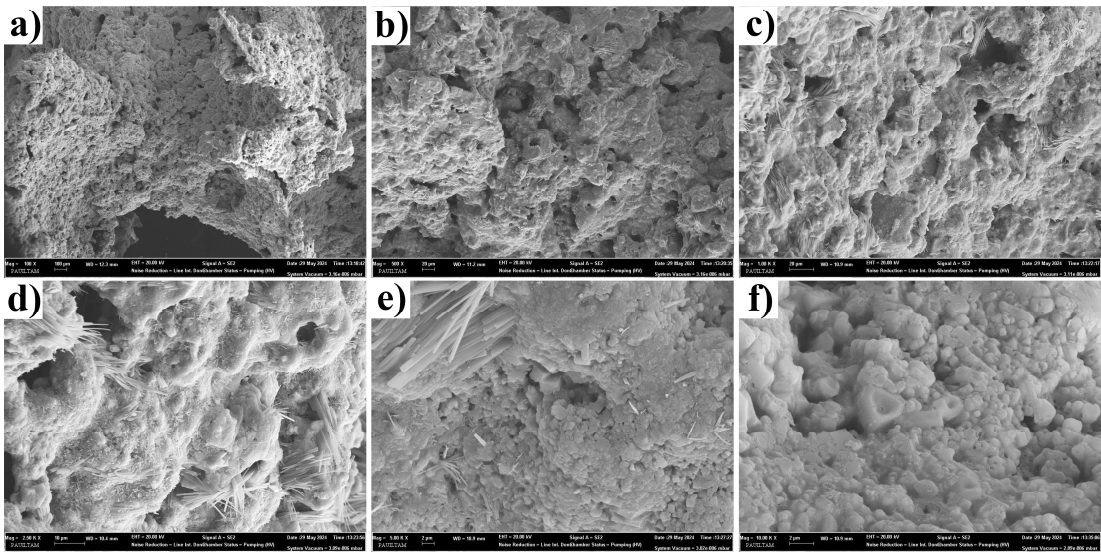
BGA



Şekil 4.5: Biyoyumluluk ve biyoaktivite testi uygulanmak üzere BGA numuneleri kullanılarak hazırlanmış doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x, f) 10000x.

BGA numunelerinin belirli bölgelerinde BG ve BGD numunelerinden farklı kristal yapılar gözlenmiştir. Bu yapıların Al_2O_3 ve SiO_2 'in yüksek sıcaklıkta sinterlenmesi sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Yapıya katılanmış alumina nanopartikülünün yüzey morfolojisini olumsuz etkileyecek herhangi bir değişime yol açmadığı görülmektedir. Şekil 4.5'te BGA numunesiyle oluşturulan doku iskelesine ait SEM görüntüleri verilmiştir.

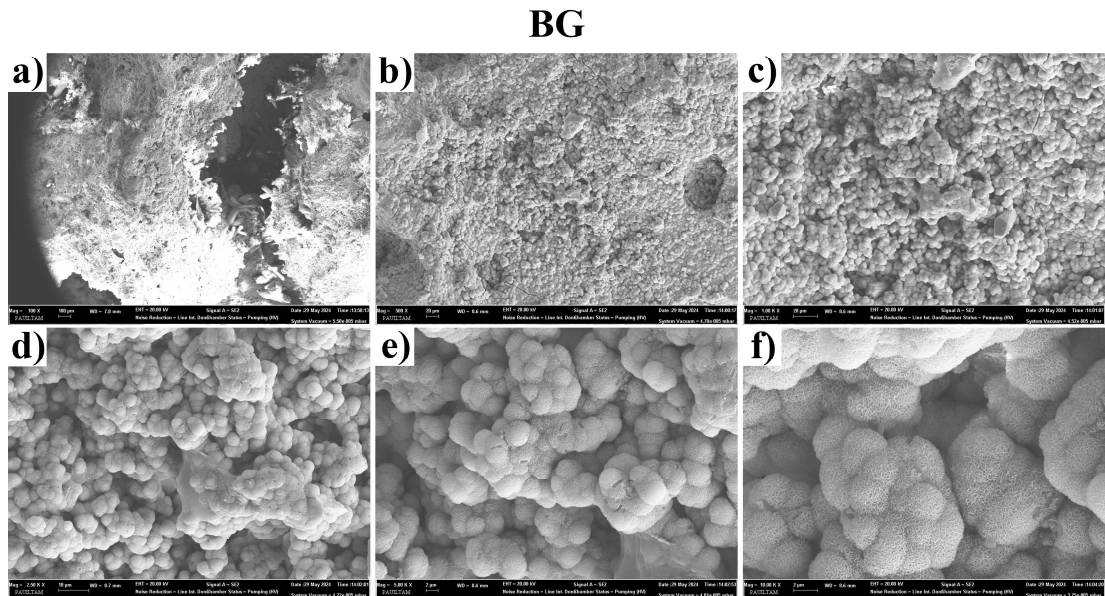
BGDA



Şekil 4.6: Biyoyumluluk ve biyoaktivite testi uygulanmak üzere BGDA numuneleri kullanılarak hazırlanmış doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x, f) 10000x.

BGDA numunesi kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin SEM görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir. BGDA numunelerinin morfolojisi incelendiğinde yapıya katılmış olan alumina nanopartiküllerinin ve diatomitin BGD ve BGA numunelerinde oluşturduğu karakteristik yapıların her ikisine ait özellikleri de taşıdığı görülmektedir. Sol-jel yöntemi kullanılarak üretilen biyoaktif camlarda ergitme yöntemine kıyasla nano boyutta gözenekli yapıların oluştuğu farklı kaynaklarda belirtilmiştir. Bu nano boyuttaki gözenekli yapıya diatomitlerde bulunan diatomların gözenekli yapısının da eklenmesi hazırlanan doku iskelesini kemik doku uygulamaları için morfolojik olarak üstün bir konuma getirmektedir.

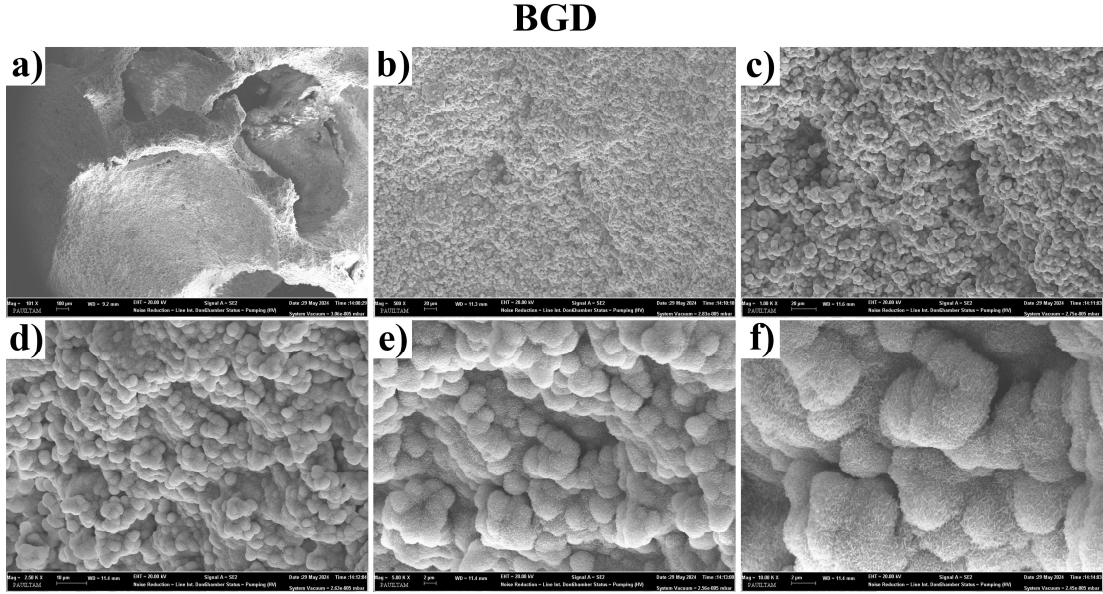
Biyoaktivite testi yapılmış numunelerin SEM analizi öncesinde numuneler SBF çözeltisinden tamamen arındırılmış ve kurutulmuştur. 30 gün süreyle yapılmış olan biyoaktivite testi sonrasında tüm doku iskelelerinin yüzeyinde HKA oluşumu gözlenmiştir. Biyoaktivite testi yapılmış numuneleri içeren görüntüler Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10'da verilmiştir. Yüzeyde oluşan apatit yapılarının yoğunlukları tüm doku iskelelerinde birbirine benzer iken oluşan HKA yapılarının morfolojik özelliklerinde farklılıklar gözlenmiştir.



Şekil 4.7: 30 gün SBF'de bekletilen BG numunelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.

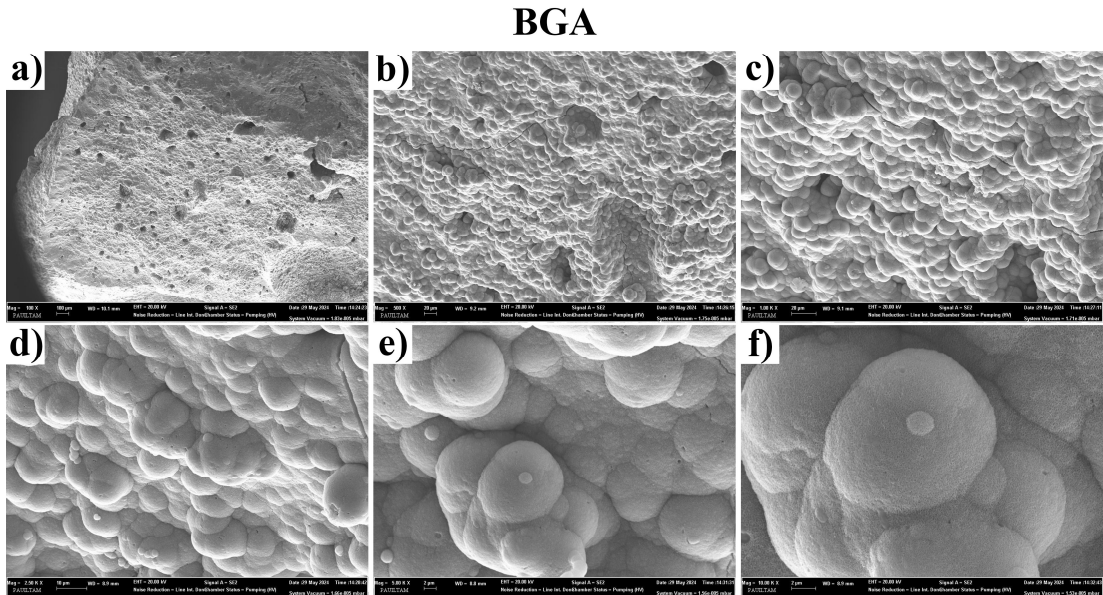
BG numuneleri ile hazırlanmış doku iskeleleri incelendiğinde, yapının içerisindeki gözenekli bölgeler de dahil olmak üzere tüm iskele yüzeyinde homojen bir apatit yapısı oluştuğu görülmektedir. 30 gün boyunca SBF çözeltisi içerisinde

tutulan BG numunesinde oluşan apatit yapısı doku iskelesinde bulunan küçük gözenekleri kapatmaya başlamış, malzeme biyobozunmasından kaynaklı olarak iskele yüzeyinde ince çatlaklar oluşmuştur.



Şekil 4.8: 30 gün SBF'de bekletilen BGD numunelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.

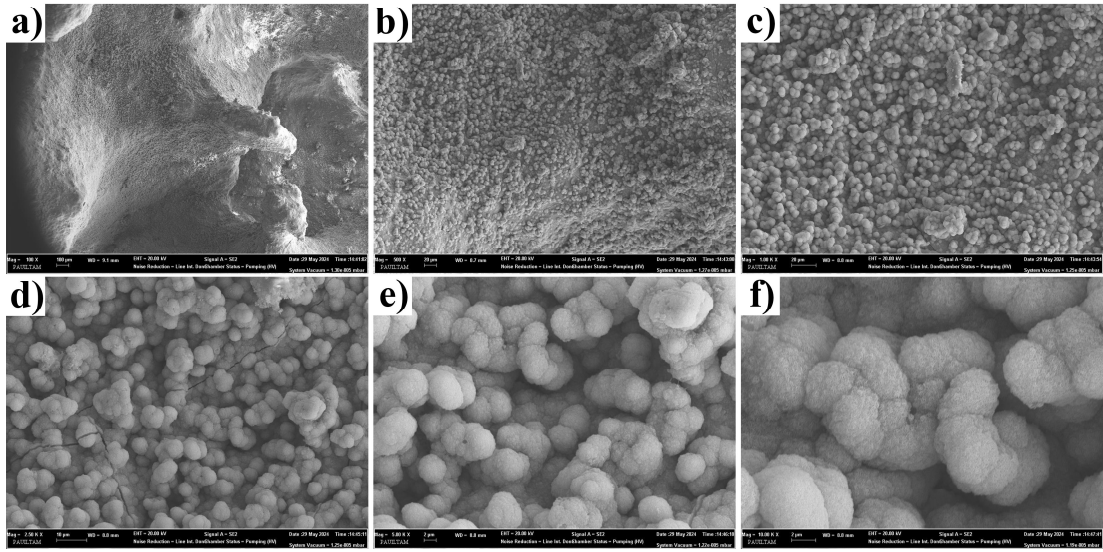
BGD numunesinde oluşan apatit yapısının yüzey morfolojisi BG numunesine kıyasla oldukça farklıdır. Apatit yoğunluğu bakımından birbirine yakın olan bu iki örnekte oluşan HKA boyutlarının da birbirine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.9: 30 gün SBF'de bekletilen BGA numunelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.

BGA numunesi kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinin yüzeyinde oluşan apatit yapısı BG ve BGD numunelerine kıyasla hem yoğunluk, hem boyut hem de yüzey morfolojisi açısından farklılıklar taşımaktadır. Yüzeyde boyutları oldukça büyük bir apatit yapısı mevcuttur ve bu apatit yapısının içerisinde mikron boyutunda gözeneklilikler gözlenmiştir. Yapıda bulunan Al_2O_3 nanopartiküllerinin bu farklı apatit morfolojisinin oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir.

BGDA



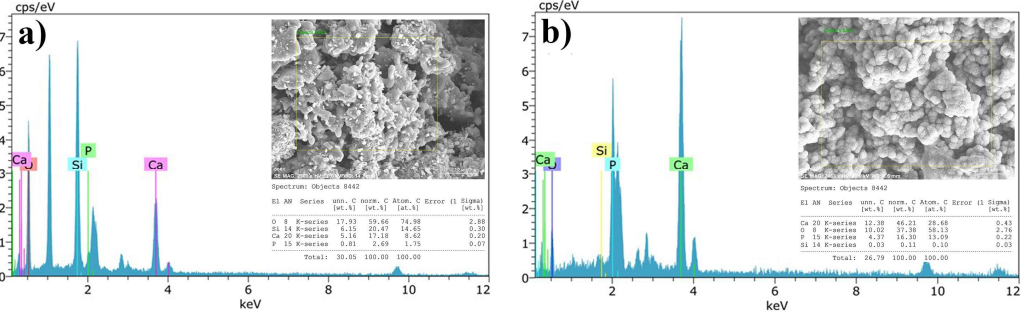
Şekil 4.10: 30 gün SBF'de bekletilen BGDA numunelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.

BGDA numunelerinin 30 gün sonundaki SEM görüntüleri incelendiğinde hem diatomit hem de Al_2O_3 nanopartiküllerinin yapıya kattığı karakteristik özelliklerin belirtilerine yapı yüzeyinde rastlamak mümkündür. Hem Al_2O_3 içeren numunelerdeki gibi büyük boyuta sahip hem de diatomit içeren yapıdaki gibi boyutu küçük ancak yoğunluğu fazla olan karma bir apatit yapısı mevcuttur, oluşan tüm apatit yapılarının yüzey morfolojileri daha çok diatomit katkılı numunelere benzemektedir.

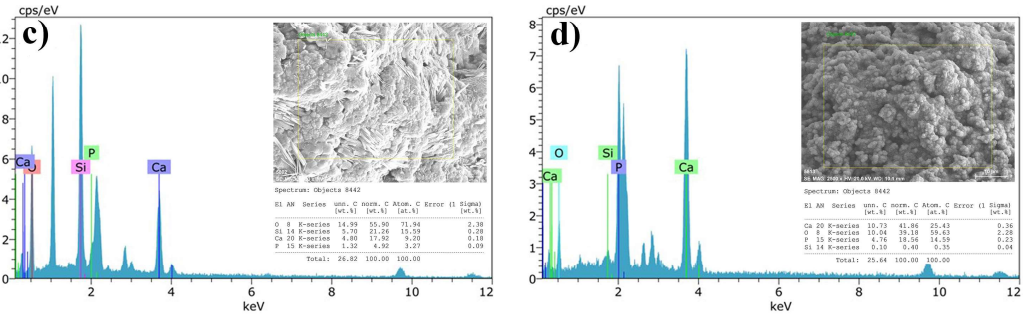
Biyoaktivite testi yapılan tüm doku iskeleleri genel olarak değerlendirildiğinde BG, BGD ve BGDA numunelerinin yüzeyleri 30 günün sonunda tamamen HKA ile kaplanmış olup morfolojik özelliklerine birbirine benzemektedir. BGA numunesinde ise apatit yapısı oldukça farklı olsa da malzeme biyoaktifliği yapılan katkılarla negatif etkilenmemiştir.

Biyoaktivite testi yapılmış ve yapılmamış numunelere ait EDS sonuçları Şekil 4.11’de detaylı bir şekilde verilmiştir.

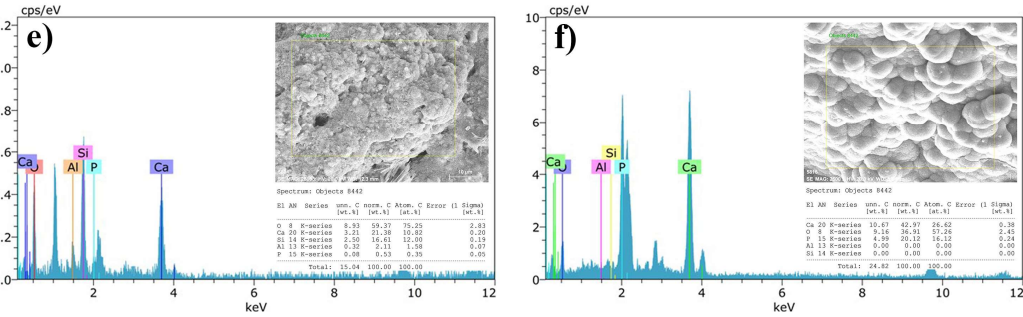
BG



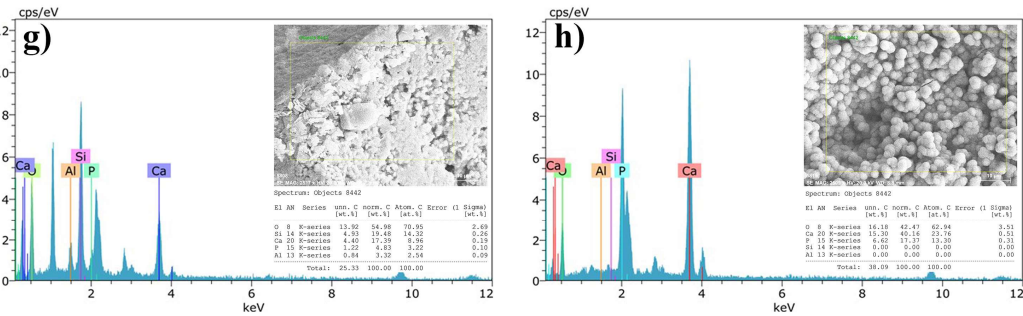
BGD



BGA



BGDA

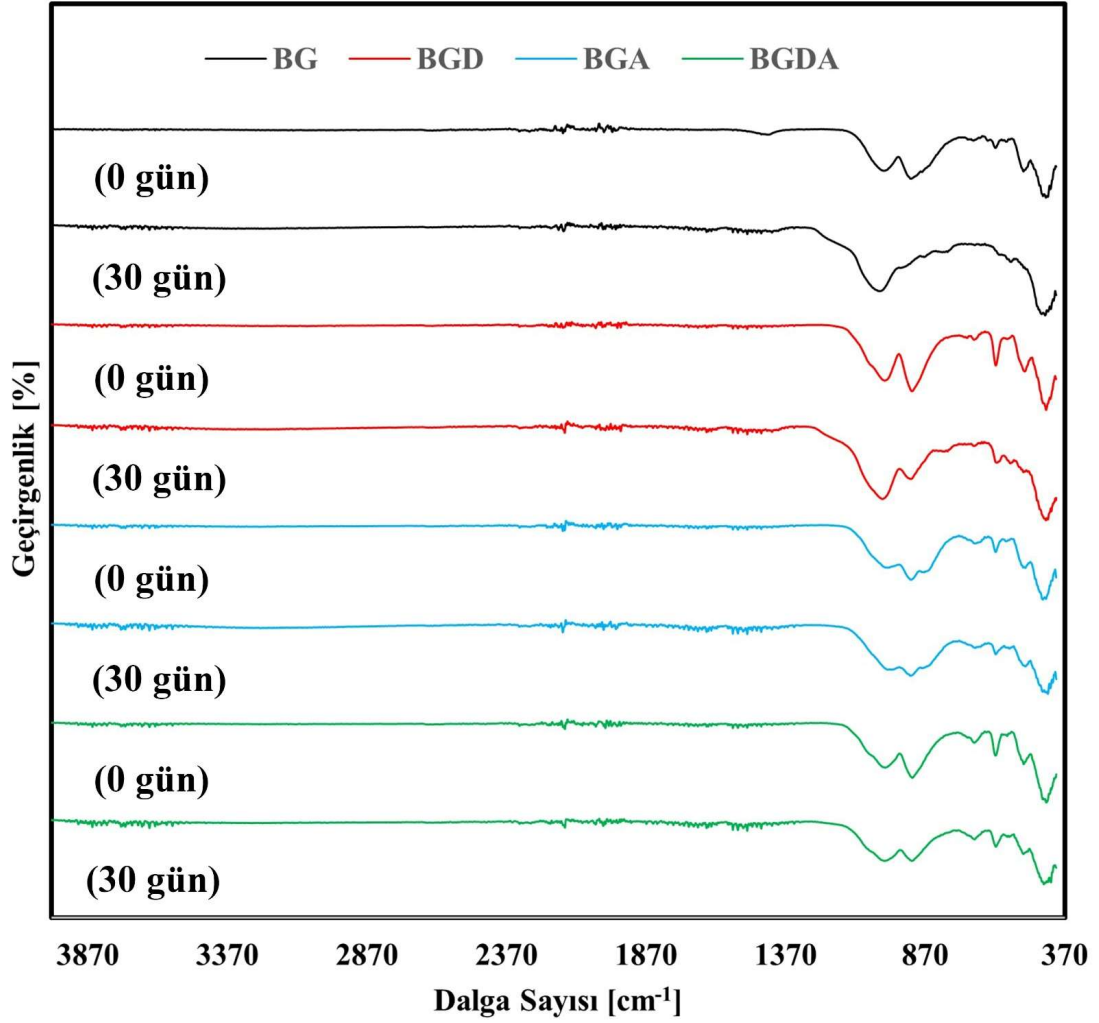


Şekil 4.11: Hazırlanan doku iskelelerinin EDS analizi sonuçları: a), c), d), e) biyoaktivite testi öncesi, b), d), f), h) biyoaktivite testi sonrası.

Biyoaktivite testi sonrasında tüm doku iskelelerinin yüzey morfolojisinde ve yapıdaki Si-Ca ve P oranlarında değişim görülmüştür. 30 gün boyunca SBF çözeltisi içerisinde bekletilen tüm doku iskelelerinin Ca ve P oranlarında artış mevcuttur. Bu artışla birlikte tüm numunelerin Si değerleri ile BGA ve BGDA numuneleri kullanılarak hazırlanmış doku iskelelerindeki Al değerleri neredeyse sıfırlanmıştır. Biyoaktif camların çalışma prensibi göz önüne alındığı zaman elde edilen EDS sonuçlarının tutarlı olduğu görülmektedir. Hidroksiapatitin Ca/P oranının incelendiği farklı çalışmalarda bu oran saf hidroksiapatit için 1,67'dir ve malzemeye uygulanan işlemlere göre bu oranın azalıp artabildiği vurgulanmıştır (Brown ve Martin 1999, Tan ve diğ. 2015). 30 günün sonunda BG numunesinin Ca/P oranı 2,190, BGD numunesinin Ca/P oranı 1,742, BGA numunesinin Ca/P oranı 1,651 ve BGDA numunesinin Ca/P oranı 1,786 çıkmıştır. Sadece BG numunesinde Ca/P oranı beklenen değerlerin üzerinde olup diğer tüm numunelerde 30 günün sonunda hidroksiapatitin sahip olduğu değerlere yaklaşık değerler elde edilmiştir. EDS analizi SBF ile seramik malzemelerin etkileşimi hakkında tutarlı bilgiler sağlasa da elde edilen verilerin dedektör hassasiyeti, numune geometrisi, numune topografyası, analiz koşulları, yüzey katmanlarının kalınlığı gibi farklı faktörlerden etkilenebileceği unutulmamalıdır (Bhakta ve diğ. 2010).

4.3.2 FT-IR Analizi

Hazırlanan BG, BGD, BGA ve BGDA doku iskelelerinin ilk versiyonları ve SBF içerisinde 30 gün biyoaktivite testi yapılmış versiyonlarına ait FT-IR grafikleri Şekil 4.12'de verilmiştir.

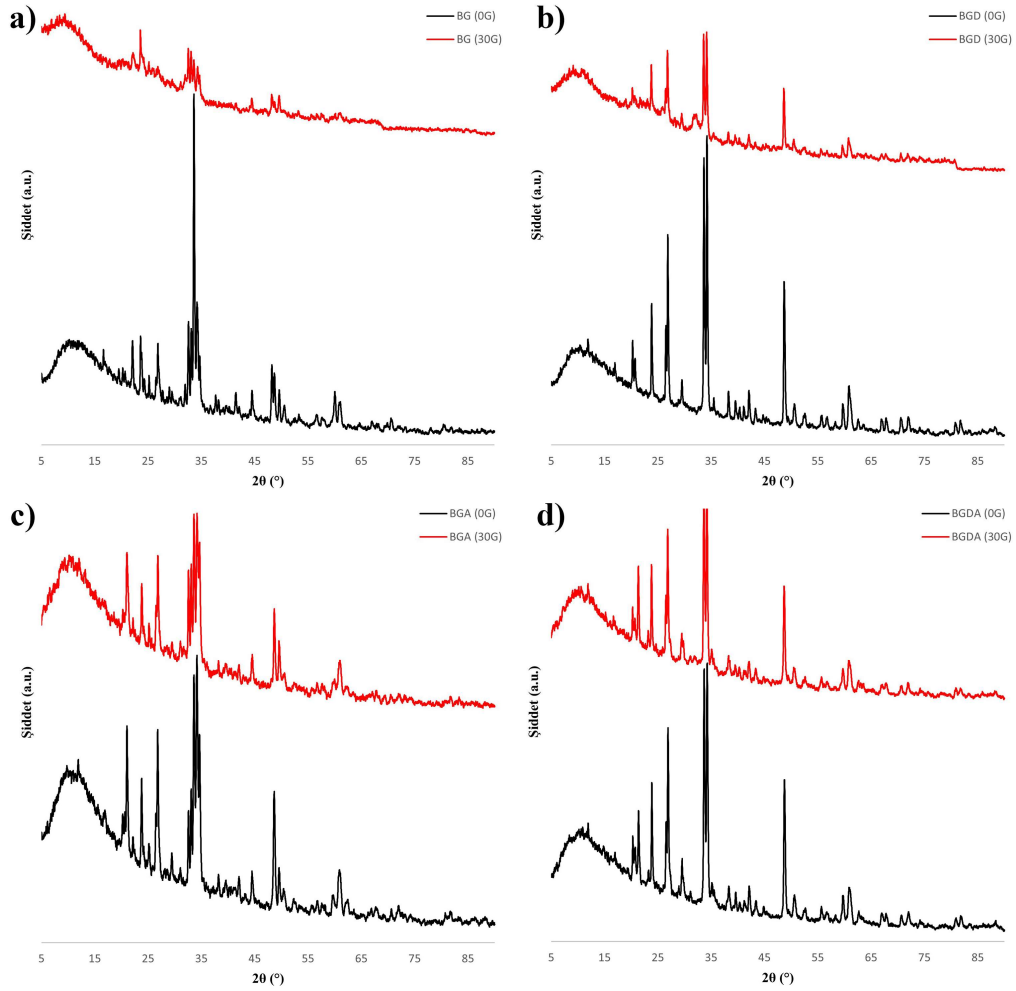


Şekil 4.12: Hazırlanan doku iskelelerinin biyoaktivite testi öncesi ve sonrası FT-IR grafikleri.

Tüm numunelerin biyoaktivite testi öncesi ve sonrasındaki FT-IR grafikleri incelendiğinde 30 gün sonundaki her numunede görülen ve malzemelerin biyoaktif özellik gösterdiğini kanıtlayan sonuçlar mevcuttur. Malzemelerde sonradan şiddetlenmiş olan 550-600 cm^{-1} aralığında ikili pik apatit kristallerinde bulunan $(\text{PO}_4)^{3-}$ 'e ait olan P-O eğilme titreşiminin karakteristik pikidir. 1050 ile 1200 cm^{-1} arasında meydana gelen değişim malzemedeki fosfata aittir ve P-O gerilim titreşimine aittir. Bu durum yüzeyde amorf yapıda $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ açısından zengin bir yapının oluştuğunu göstermektedir (Liu ve Miao 2004). Biyoaktivite testi öncesi ve sonrası numunelerden elde edilen EDS sonuçlarında Ca ve P değerlerindeki ciddi artış ve XRD grafiklerindeki piklerde yaşanan düşüş de bu sonucu destekler niteliktedir.

4.3.3 XRD Analizi

Hiçbir işlem uygulanmamış ve 30 gün boyunca SBF içerisinde bekletilmiş numunelere ait grafikler Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.13: Doku iskelelerinin biyoaktivite testi öncesi ve sonrasındaki XRD grafikleri a) BG, b) BGD, c) BGA, d) BGDA.

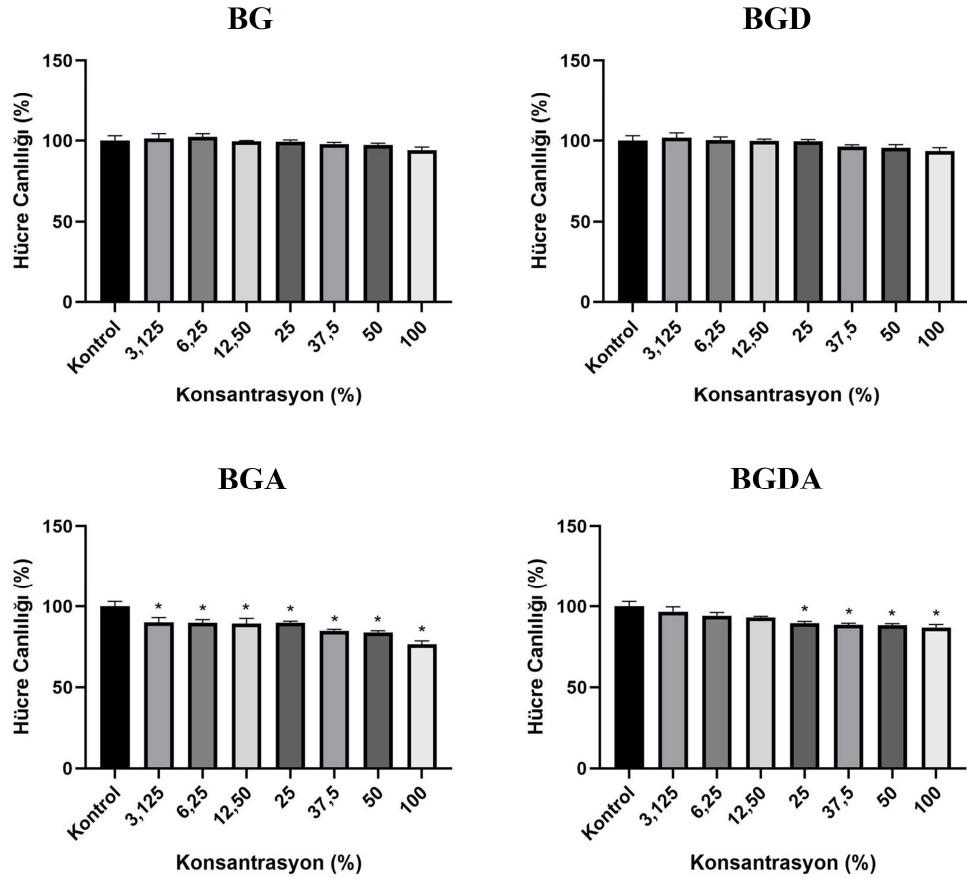
XRD sonuçları incelendiğinde, hazırlanan tüm numunelerin içeriğinde $\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$ bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sodyum-kalsiyum-silikat fazı biyoaktif camların ısıtılması sonrasında oluşan bir yüzey modifikasyonudur. $\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$, hazırlanan numunelerin içerisindeki CaO miktarının zamanla bitmesinden ötürü en fazla 80 %mol oranında oluşabilir (Pirayesh ve Nychka 2013). Elde edilen XRD sonuçları ICDD Card No: 01-079-1088 ile uyumludur. $\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$ yapısı hegzagonal olup $a = 10,513 \text{ \AA}$ ve $c = 13,195 \text{ \AA}$ olarak verilebilir. Ayrıca bazı yapılarda 22° 'de $\text{Na}_4\text{Ca}_3\text{Si}_3\text{O}_9$ fazı da tespit edilmiştir. 30 günlük biyoaktivite testi

sonrasında SBF içerisinde bekletilmeden alınan XRD sonuçlarındaki kristal yapının yerini daha amorf bir yapıya bıraktığı gözlenmiştir. Pik şiddetlerinde yaşanan düşüş ve genişliklerin artması bunun bir göstergesidir. 30 gün boyunca SBF içerisinde bekletilen malzemelerdeki 26° ile 32°'de oluşan pikler yüzeyde oluşmuş olan apatit yapısını göstermektedir (Rezaei ve diğ. 2014, Dang ve diğ. 2020). Sonuç olarak XRD sonuçlarından elde edilmiş olan veriler SEM görüntüleri, EDS analiz sonuçları ve FT-IR sonuçlarıyla tutarlıdır ve hazırlanmış olan biyoaktif cam esaslı doku iskelelerinin hepsi kemik doku iskelelerinde kullanılabilirlikte yeterlilikte biyoaktivite göstermiştir.

4.4 L929 Hücre Hattıyla Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.4.1 Sitotoksitite Testi Sonuçları

Çalışmada kullanılan doku iskelelerinin %3,125, %6,25, %12,5, %25, %37,5, %50 ve %100 konsantrasyonlarındaki L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksitite etkilerine incelemek için 24 saat boyunca sitotoksitite testi yapılmıştır. Yapılan sitotoksitite testi sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir. Hücre canlılık testi (MTT) ile elde edilen sonuçları değerlendirildiğinde BG ve BGD doku iskelelerinin en yüksek doz olan %100 değerleri negatif kontrol ile kıyasladığında sitotoksitite etkisi saptanmamıştır. BGA ve BGDA doku iskeleleri ise negatif kontrol ile kıyasladığımızda doza bağlı hafif bir etki rastalanmıştır. Sonuç olarak çalışmada kullanılan doku iskelelerinin fare fibroblast hücre hattında ciddi bir sitotoksitite etkisi olmadığı saptanmıştır.

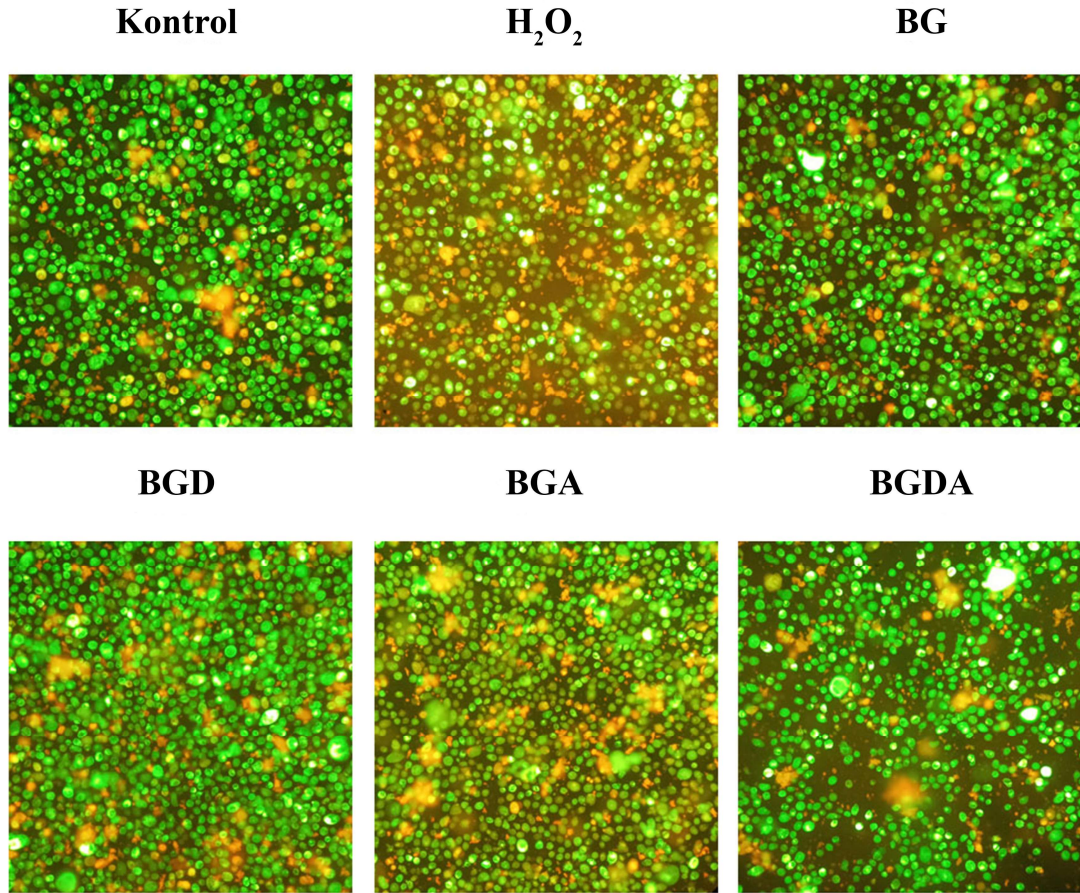


Şekil 4.14: Doku iskelelerinin L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksosite sonuçları.

4.4.2 Floresan Mikroskop Çalışma Sonuçları

Hücre canlılık testi (MTT) sonucunda doku iskelelerinin sitotoksosite etkileri olmadığı için en yüksek dozları (%100) seçilmiş ve Etidyum bromür ve Akridin oranj (EB/AO) boyama ile floresan mikroskop analizi gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 3×10^4 adet olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekilen hücrelerle doku iskelelerinin %100 konsantrasyonlarıyla 24 saat uygulama yapılmış ve sürenin sonunda hücreler toplanarak EB/AO boyası ile boyanmıştır. Boyanan hücreleri floresan mikroskopu altında incelediğinde, pozitif kontrol olarak kullanılan H_2O_2 negatif kontrol ile karşılaştırmalı olarak baktığımızda yeşil olarak boyanmış canlı hücrelerin pozitif kontrolde oranı çok azaldığı ve apoptotik (sarı olarak boyanmış) ve ölü (kırmızı olarak boyanmış) hücrelerin oranları yükseldiğini ve buda H_2O_2 toksisite etkisini göstermiştir. Ayrıca BG, BGD, BGA ve BGDA doku iskelelerinin sonuçlarını negatif kontrol ile karşılaştırmalı olarak incelediğimizde BG, BGD ve BGDA numunelerin

negatif kontrol ile yakın etki rastlanmıştır. Ancak BGA numunesi ise negatif kontrole göre hücrelerin apoptoza ve ölüme uğramalarına neden olmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak malzemeye yapılan diatomit katkısının alumina nanopartikülleri sebebiyle oluşan düşük seviyedeki toksik etkiyi baskıladığı söylenebilir.

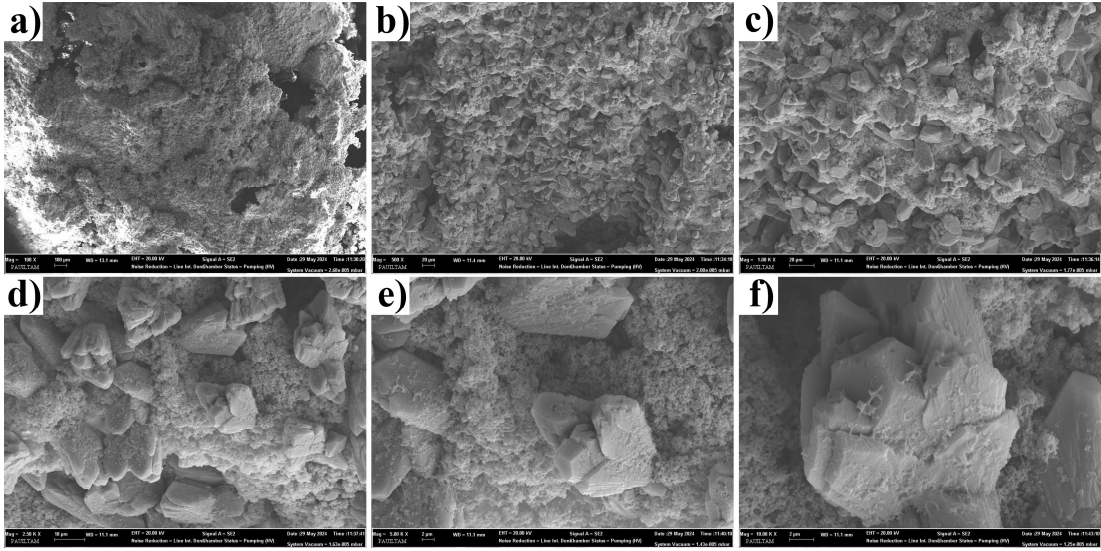


Şekil 4.15: Doku iskelelerinin floresan mikroskop görüntüleri.

4.4.3 L929 Hücre Hattı Uygulanan Doku İskelelerinin SEM Analizi

8 günlük hücre kültürü sonrasında tüm numunelere sırasıyla fiksasyon, dehidrasyon ve kurutma işlemi uygulanarak doku iskeleleri SEM analizine hazırlanmıştır. Hücre kültürü uygulanmış doku iskelelerine ait görüntüler Şekil 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19'da verilmiştir. Tüm iskele formların 8 günlük kültür sonrası iskele yüzeyinde aktif hücre yapışması gözlenmiştir ancak bu tutunmanın yoğunluğu ve yapısında farklılıklar mevcuttur.

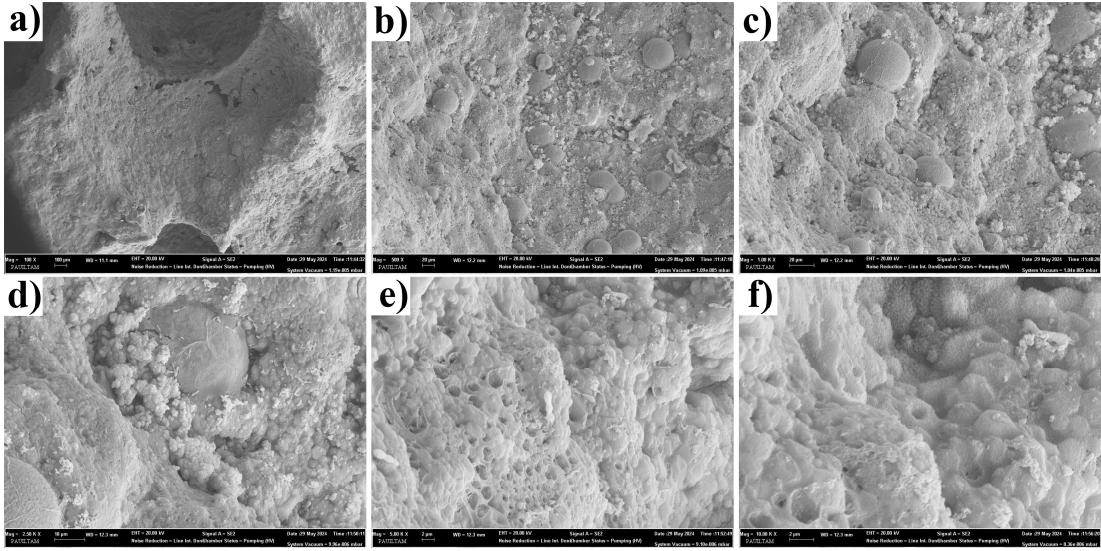
BG



Şekil 4.16: L929 hücre hattı ekilmiş BG numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.

BG numunesi kullanılarak hazırlanan kemik doku iskelelerinin yüzeyinde kültür sonrası hücrelerin yapışması normal düzeyde olup hücrelerin gözenekli yapıların içlerine de sorunsuz bir şekil ulaştığı gözlenmiştir. Yüze yayılmış olan hücrelerin kültür uygulaması sonunda yüzeyde çoklu hücreye sahip katmanlar oluşturduğu görülmüştür. BG ile üretilen doku iskelelerinin L929 hücre hattı ile kültür uygulaması sonrasında farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri Şekil 4.16’da verilmiştir. BG numunesi herhangi bir ek katkı içermediği için bu süreçte kontrol numunesi olarak incelenmiştir.

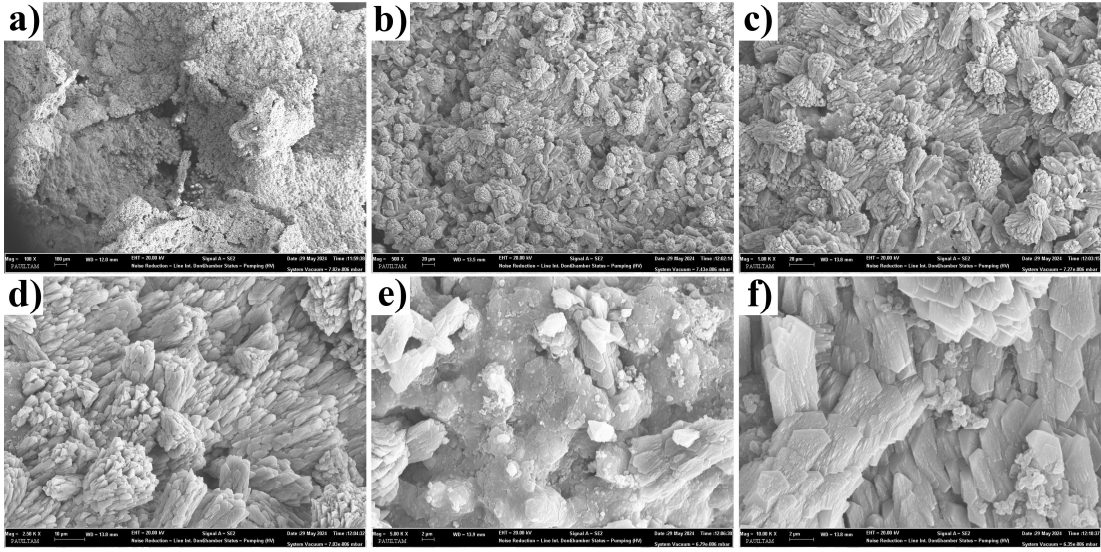
BGD



Şekil 4.17: L929 hücre hattı ekilmiş BGD numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.

BGD numuneleri ile oluşturulan kemik doku iskelelerinin L929 hücre hattı ile etkileşimini gösteren SEM görüntüleri Şekil 4.17’de verilmiştir, bu doku iskelelerinde yüzeye bağlı hücre tutunması daha yoğun bir şekilde gözlenmiştir. Tutunmadaki artışın ana etkeninin diatomit katkısı ve diatomitlerde bulunan diatomlardan kaynaklı olarak yüzeyde oluşan ekstra gözeneklilik olduğu düşünülmüştür. Yapı detaylı bir şekilde incelendiğinde yüzeyde içi boş bir şekilde görülen gözenekli yapıların ısıtma işlem sonunda diatomların frustüllerinde meydana gelen morfolojik değişimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu gözenekli yapı hücre kültürü sonuçlarını pozitif yönde etkilemekle birlikte potansiyel bir kemik doku mühendisliği uygulamasında hasarlı bölgeye substrat transferini artırarak kemik gelişimini destekleyici bir işleve de sahip olacaktır.

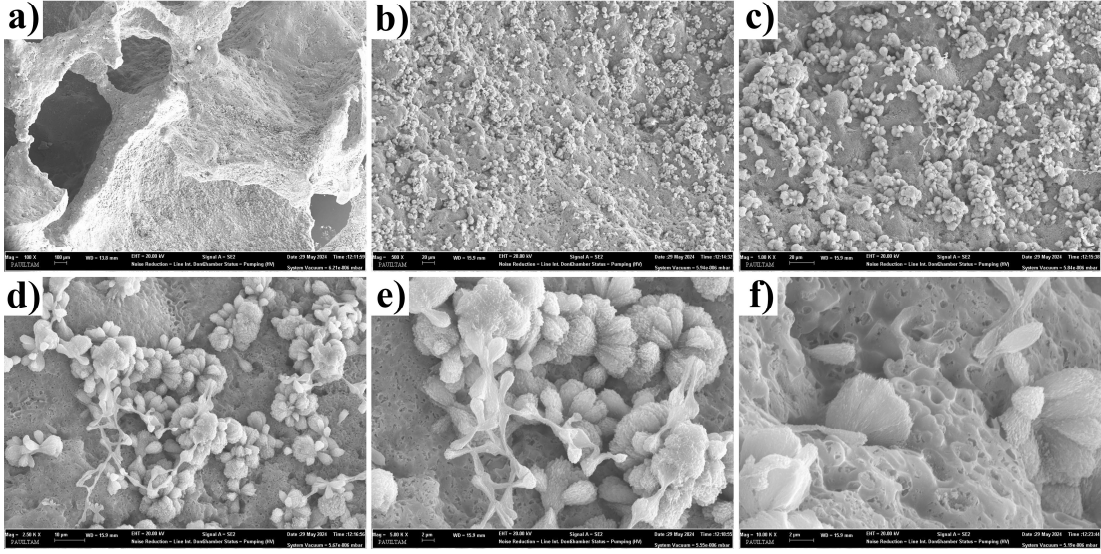
BGA



Şekil 4.18: L929 hücre hattı ekilmiş BGA numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.

BGA numuneleri kullanılarak üretilmiş kemik doku iskelelerinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri Şekil 4.18’de verilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde hücre tutunması ve yoğunluğunda BG ve BGD numunelerine kıyasla azalma görülmüştür ancak literatürü destekleyecek şekilde alumina nanopartiküllerinin doku iskelesi yapısında bulunması hücrelere ciddi bir zarar vermemiştir. Bu durum alumina nanopartiküllerinin belirli bir miktarın üstünde kullanılmaması durumunda ciddi toksik etkiye sebep olmadığını göstermektedir ve bu sonuç literatürde alumina nanopartikülleri üzerine yapılan çalışmalar ile uyumludur (Owji ve diğ., 2019). Bu azalma doku iskelelerinden elde edilen sitotoksikite sonuçlarıyla uyumludur. BGA iskelelerinin yüzeyinde ısıl işlem kaynaklı olduğu düşünülen yoğun bir Ca-P tabakası ve kristalleşme mevcuttur ve bu sebeple doku iskelesinin iç gözeneklerindeki hücre tutunmasını net bir şekilde incelemek mümkün olmamıştır. SEM görüntüleri elde edilen sitotoksikite sonuçları, floresan mikroskop sonuçları ve literatürde bulunan bilgiler ile birlikte biyouyumluluk üzerine ele alındığı zaman kemik doku mühendisliği için alumina nanopartiküllerinin, alumina makropartiküllerine kıyasla çok daha iyi bir alternatif olduğu görülmektedir.

BGDA



Şekil 4.19: L929 hücre hattı ekilmiş BGDA numunesinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri a) 100x, b) 500x, c) 1000x, d) 2500x, e) 5000x f) 10000x.

BGDA numunesinde hücre tutunması hem ağsı bir yapı şeklinde görülmüştür hem de yüzeyde bir örtü halinde gözlenmiştir. Yapı hem BGD hem de BGA numuneleri ile hazırlanan doku iskelelerinde görülmüş karakteristik yapıları taşımaktadır. BGA numunelerinde de görülmüş olan kristal yapının morfolojisi BGDA numunesi ile üretilen doku iskelesinde farklıdır ve kristaller diatomitlerden kaynaklı olan içi boş frustüller ile çevrelenmiş durumdadır. Bu durum hücre tutunmasını artırıcı bir özelliktir ve sitotoksikite sonuçlarında da görüldüğü gibi alumina nanopartiküllerinden kaynaklanan toksik etkiyi azaltıcı bir etkiye sebep olduğu söylenebilir.

Kültür uygulaması öncesi doku iskelelerinin besiyerinde bekletilmesinin, besiyerinde bulunan biyolojik moleküllerin yüzeydeki Ca-P açısından zengin yüzeye adsorpsiyonunu desteklediği ve bu sayede yüzeydeki hücre tutunmasını arttırdığı düşünülmektedir. Literatürden elde edilen veriler de bu durumu destekler niteliktedir (Xynos ve diğ. 2000).

Biyoaktif camlar üzerine yapılan çalışmalar incelendiği zaman 200 ve 700 derecelere ait FT-IR grafiklerinden elde edilen piklerin literatürle uyumlu sonuçlar gösterdiği gözlenmiştir. Pirayesh ve Nychka (2013) yapmış oldukları bir çalışmada sol-jel yöntemi kullanarak 45S5 kompozisyona sahip toz biyoaktif camlar üretmişlerdir ve hazırladıkları biyoaktif camlara 500, 550, 600, 700 ve 800 derecede

ısıtıl işlem uygulamışlardır. Çalışmanın XRD grafiklerine bakıldığı zaman, bu tez çalışmasında da elde edilmiş $\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$ yapısı görülmüştür. XRD sonuçlarını desteklemek için yapmış oldukları FT-IR analizi sonunda 520, 580 ve 620 cm^{-1} bandlarında kristal formda P-O eğilme titreşimleri saptamışlardır. Yapılmış olan tez çalışmasında üretilen tüm numunelerde benzer band aralıklarında aynı yapılara ait olan pikler mevcuttur. Aynı aralıktaki pikleri Aguiar ve arkadaşları (2009) tarafından yapılmış olan ve spesifik olarak sol-jel yöntemiyle üretilen biyoaktif camların FT-IR ve Raman spektroskopilerinin incelendiği çalışmada da görmek mümkündür.

Chen ve arkadaşları (2006) 45S5 Bioglass® biyoaktif cam kompozisyonu kullanarak polimer sünger yöntemiyle doku iskeleleri üretmiş ve bu doku iskelelerinin farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş hallerinin SEM görüntülerini almışlardır. Yapmış oldukları çalışmada malzemelerin sinterlenmesi sürecinde ortaya çıkan $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ fazının doku iskelesine mümkün olan en yüksek sertlik değerini verdiği ve bu fazın vücut sıvısı içerisinde bekletilmesi sonrasında yerini amorf kalsiyum fosfat yapısına bırakmasının üzerinde durulmuştur. Buradan yola çıkarak bu tez çalışmasında üretilen biyoaktif camların ve kullanılan doku iskelesinin potansiyel bir uygulamada tedavi bölgesinde geçici bir süre boyunca gerekli olan mekanik dayanımı başarılı bir şekilde sağlayacağı ve bu süreçte malzeme biyoaktivitesinin negatif bir şekilde etkilenmeyeceği görülmektedir. Bu sonuçlara ek olarak bu tez çalışmasında hazırlanan sol-jel yöntemiyle üretilmiş biyoaktif camlara yapılan diatomit katkısının malzemenin biyouyumluluğunu ve biyoaktifliğini artırması literatürde yapılan uygulamalardan daha avantajlı bir kompozisyon oluşturulduğunu göstermektedir. Malzemedeki kristalliliğin kontrol edilebilir olması amorf kalsiyum fosfat yapı oluşumunun da kontrol edilebilirliği göstermektedir, bu sonuç polimer sünger kopyalama yöntemiyle oluşturulan doku iskelelerinde malzeme kalitesini etkileyecek ekstra bir parametrenin daha bulunduğunu göstermektedir. Arstila ve arkadaşları (2008) tarafından yapılmış olan bir çalışmada bu parametrenin üzerinde durulmuş, 45S5, 1-98 ve 07-04 biyoaktif camlarında ısıtıl işlemin malzeme kristalleşmesine etkisi incelenmiştir. Çalışmada hazırlanan her kompozisyonda amorf kalsiyum fosfat oluşumunu destekleyici fazların farklı sıcaklık değerlerinde ortaya çıkmaya başladığı görülmektedir. Bu fazların oluşum sürecinin kontrol edilebilmesi sadece bu tez çalışmasında değil, ileride biyoaktif camlar kullanılarak yapılacak çalışmalarda malzemedeki alınacak verimin maksimum değere çıkartılmasını sağlayacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Diatom yüksek biyoyumluluğa sahip, yüzey morfolojisi açısından kemik doku iskelelerinden beklenen özellikleri karşılayan bir malzeme olmasına rağmen kemik doku mühendisliği alanında sık kullanılmayan bir malzemedir. Buna ek olarak hem diatomların hem biyoaktif camların içeriğinin çoğunun silikadan oluşmasına rağmen literatür incelendiğinde diatomların biyoaktif camlarla birlikte kullanıldığı yayın sayısı çok azdır. Bu tez çalışmasında literatürdeki bu eksiği gidermek amacıyla diatomit ile katkılanmış biyoaktif cam esaslı kompozit malzemeler üretilmiş ve biyoaktif camlarda mevcut olan yüksek sinterleme sıcaklığı, düşük mekanik dayanım gibi sorunları azaltmak için alumina nanopartikülleri içeren biyoaktif cam numunelerinin üretimi ve karakterizasyonu yapılmıştır. Toz numunelerin farklı sıcaklıklarda sahip oldukları yapılar ve sıcaklık değişimine bağlı olarak bu yapılardaki değişimleri gözlemek amacıyla numunelere FT-IR analizleri yapılmıştır.

Toz formdaki biyoaktif camların karakterizasyon işlemlerinin tamamlanmasının ardından katkı içermeyen BG, diatomit içeren BGD, alumina nanopartikülü içeren BGA ve hem diatomit hem de nano alumina içeren BGDA numuneleri kullanılarak kemik doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan doku iskelelerinin yüzey morfolojilerinin, kimyasal yapılarının, SBF ve hücre kültürü ortamında gösterdiği özelliklerin incelenmesi için doku iskelelerine de belirli şartlar altında SEM, FT-IR ve XRD analizleri yapılmıştır. Doku iskelelerinin yüzeyde apatit oluşturma özelliklerinin testi tüm doku iskelelerinin 30 gün süreyle SBF içerisinde bekletilmesi ile incelenmiştir. Malzemelerin sitotoksitesite testleri ve malzeme yüzeyine hücrelerin tutunması için L929 hücre hattı ile kültür yapılmış, hücrelerin fiksasyon, dehidrasyon ve kurutma süreçleri sonrasında iskelelere SEM analizi yapılmıştır.

Toz numunelerin FT-IR sonuçları incelendiği zaman literatür ile tutarlı sonuçların elde edildiği görülmüş olup toz numunelerin doku iskelesi uygulamalarında kullanılabilmesi için gerekli olan ön işlem sıcaklığı 700 °C olarak bulunmuştur. Bunun sebebi bu sıcaklık değerinde yapıdaki nitratların tamamen ortadan uzaklaşması ve malzemelerin kristalleşmesinin başlangıç seviyesinde olmasıdır.

Polimer sünger kopyalama yönteminde kullanılan poliüretan süngerler, biyoaktif cam tabanlı doku iskelelerinin üretilmesi için başarılı bulunmuştur ancak

malzemelerin mekanik dayanımının artırılması için çalışmalarda farklı şablon malzemeler kullanılabilir. Kullanılan bağlayıcı türüyle birlikte hazırlanan sıvıya homojenleştirici özelliği olan bir malzemenin eklenmesi üretilecek olan doku iskelelerinin kalitesini arttıracaktır.

1100 °C’de sinterlenmiş olan doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde her yapıda farklı kristal fazların görülmesi, bazı doku iskelelerinde kristalleşmenin diğerlerine oranla daha fazla olması malzeme yapısındaki katkıların sinterleme sıcaklığını değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. Bu problemin çözülmesi için numunelere TGA/DSC analizi yapılmasının gerekli olduğu görülmüştür. Doku iskelelerindeki kristalleşme oranı hücre kültürü ve biyoaktivite test sonuçları üzerinde de etkili olmuştur.

30 gün boyunca SBF içerisinde bekletilen doku iskelelerinin hepsinde biyoaktif özellik gözlenmiştir, bu süreçte doku iskelelerinin SEM/EDS, FT-IR ve XRD sonuçlarının hepsi birbirini desteklemektedir ve malzemelerin hepsinin yüzeyinde hidroksiapatitin Ca/P oranına yaklaşık değerlerde apatit yapıları oluşmuştur. Bu sonuçlar hazırlanan biyoaktif cam numunelerine yapılan katkıların malzeme biyoaktivitesini negatif yönde etkilemediğini ve BGD ile BGDA numunelerinde diatomitten kaynaklı olarak apatit oluşumunun pozitif yönde etkilendiği söylenebilir.

L929 hücre hattı kullanılarak yapılan 8 günlük hücre kültürü ve sitotoksosite uygulaması sonrasında, hazırlanan tüm doku iskelelerinin potansiyel bir uygulamada kullanılabilmesi görülmüştür. Al₂O₃ nanopartiküllerinin yapıya eklenmesi düşük seviyede toksik bir etkiye yol açmış olsa da diatomit katkısı bu etkiyi baskılayıcı bir özellik göstermiştir. Buna ek olarak Al₂O₃ nanopartiküllerinin kontrollü miktarlarda kullanılmasının potansiyel nanokompozit malzeme üretim uygulamalarında başarılı sonuçlar vereceği görülmüştür. 8 günlük hücre kültürü uygulamasında doku iskelelerinin hepsinin yüzeyinde hücrelerin başarılı bir şekilde tutulduğu gözlenmiştir. Burada malzeme yüzeyinde yapılacak bazı değişimler ile bu tutunma oranının artırılabilmesi öngörülmektedir.

Çalışmanın sonunda diatomitin biyoaktif camlar için umut verici bir katkı maddesi olduğu ve malzeme fonksiyonuna herhangi bir şekilde zarar vermediği gözlenmiştir. Diatomitlerde bulunan diatom kalıntılarının sahip olduğu gözenekli yapı

biyoaktif camlara eklendiği zaman malzemelerin iskele özelliklerinde artış gözlenmiştir. Dünya genelinde farklı kompozisyonlarda mineraller ve farklı frustül yapılarına sahip diatomlar içeren birçok diatomit türü bulunduğu da hesaba katılırsa biyoyumluluk, biyoaktivite, gözeneklilik, mekanik dayanım gibi birçok özelliği farklı yönlerden etkileyecek birçok seramik tabanlı malzemenin geliştirilebileceği görülmektedir. Alumina nanopartikülü içeren numuneler sitotoksisite sonucunda literatürle tutarlı bir şekilde çok düşük bir miktar toksik özellik göstermiştir ancak BGDA numuneleri de alumina nanopartikülü içermesine rağmen bu numunelerde toksisite değerleri normal çıkmıştır. Diatomitlerin içerdiği diatomlar fiziksel yapıları gereği potansiyel bir kemik iskelesinden beklenen birçok özelliği arttırıcı özellik göstermiştir. Yapılan katkıların biyoaktif camların biyoaktivitesi ve biyoyumluluğu üzerinden ciddi negatif etkilere yol açmadığı gözlemlenirken, tam tersine ana malzemenin birçok özelliğini destekleyici özelliklere sahip oldukları görülmüştür.

Yapılan katkılar çalışmadan beklendiği üzere malzemelerin biyoaktif özelliklerini arttırmış, sinterleme sıcaklıklarında düşmeye sebep olmuştur. Bu sonuçlar göz önüne alındığı zaman yapılan katkıların malzeme yapısını olumlu etkilediği ve başarılı kompozit malzemelerin oluşturulduğu anlaşılmaktadır. Kullanılan katkıların ve oluşturulan kompozisyonların orijinalliği, biyoaktif camlar gibi oldukça eski bir tarihe sahip malzemelerin bile özelliklerini arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmasına devam edilebileceğini göstermektedir. Bu sebeple yapılmış olan bu tez çalışması kemik doku mühendisliği alanında üretilebilecek olan farklı kompozit malzeme kompozisyonlarının da önünü açmaktadır.

Öneriler

Çalışmadaki şablon malzemelere kıyasla gözenekliliğin biraz daha kontrollü bir şekilde yapılabileceği, seramik köpürtme tarzı yöntemlerle oluşturulabilecek olan kemik doku iskelelerinin mekanik olarak daha güçlü özellikler göstereceği düşünülmektedir. Farklı diatomit çeşitleri incelenip bunların içerisinde doku iskelesi uygulamaların kullanılmaya uygun diatomlar içeren diatomitler ile katkılanan biyoaktif camlar hazırlanması iskelelerden alınacak verimi arttıracaktır. Hazırlanan doku iskeleleri üzerinde yapılacak yüzey modifikasyonları ile biyoyumluluk, mekanik dayanım, dokuya bağlanma gibi özellikler arttırılabilecektir. Bu sayede kemik doku mühendisliği alanına da önemli katkılar sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

Aguiar, H., Serra, J., González, P., León, B., “Structural study of sol–gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies”, *J. Non-Cryst. Solids*, 355 (8), 475–480, (2009).

Akbarzadeh, R., Yousefi, A.-M., “Effects of processing parameters in thermally induced phase separation technique on porous architecture of scaffolds for bone tissue engineering”, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 102 (6), 1304–1315, (2014).

Al-Rubayee, W.T., Abdul-Rasheed, O.F., Ali, N.M., “Preparation of a Modified Nanoalumina Sorbent for the Removal of Alizarin Yellow R and Methylene Blue Dyes from Aqueous Solutions”, *J. Chem.*, 2016 (1), 4683859, (2016).

Ansari, A.I., Sheikh, N.A., “A Review of Bone Regeneration Mechanisms and Bone Scaffold Fabrication Techniques (Conventional and Non-Conventional)”, *J. Inst. Eng. India Ser. C*, 103 (6), 1485–1513, (2022).

Arstila, H., Hupa, L., Karlsson, K.H., Hupa, M., “Influence of heat treatment on crystallization of bioactive glasses”, *J. Non-Cryst. Solids*, 354 (2), 722–728, (2008).

Asadi, N., Del Bakhshayesh, A.R., Davaran, S., Akbarzadeh, A., “Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine”, *Mater. Chem. Phys.*, 242, 122528, (2020).

Aw, M.S., Simovic, S., Yu, Y., Addai-Mensah, J., Losic, D., “Porous silica microshells from diatoms as biocarrier for drug delivery applications”, *Powder Technol.*, 223, 52–58, (2012).

Bahraminasab, M., Janmohammadi, M., Arab, S., Talebi, A., Nooshabadi, V.T., Koohsarian, P., Nourbakhsh, M.S., “Bone Scaffolds: An Incorporation of Biomaterials, Cells, and Biofactors”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 7 (12), 5397–5431, (2021).

Baino, F., Fiume, E., Miola, M., Verné, E., “Bioactive sol-gel glasses: Processing, properties, and applications”, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 15 (4), 841–860, (2018).

Baino, F., Hamzehlou, S., Kargozar, S., “Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?”, *J. Funct. Biomater.*, 9 (1), 25, (2018).

Baldwin, P., Li, D.J., Auston, D.A., Mir, H.S., Yoon, R.S., Koval, K.J., “Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and

Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery”, *J. Orthop. Trauma*, 33 (4), 203, (2019).

Bhakta, S., Pattanayak, D.K., Takadama, H., Kokubo, T., Miller, C.A., Mirsaneh, M., Reaney, I.M., Brook, I., van Noort, R., Hatton, P.V., “Prediction of osteoconductive activity of modified potassium fluorrichterite glass-ceramics by immersion in simulated body fluid”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 21 (11), 2979–2988, (2010).

Blair, H.C., Larrouture, Q.C., Li, Y., Lin, H., Beer-Stoltz, D., Liu, L., Tuan, R.S., Robinson, L.J., Schlesinger, P.H., Nelson, D.J., “Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro”, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 23 (3), 268–280, (2017).

Boccardi, E., Philippart, A., Melli, V., Altomare, L., De Nardo, L., Novajra, G., Vitale-Brovarene, C., Fey, T., Boccaccini, A.R., “Bioactivity and Mechanical Stability of 45S5 Bioactive Glass Scaffolds Based on Natural Marine Sponges”, *Ann. Biomed. Eng.*, 44 (6), 1881–1893, (2016).

Brougham, C.M., Levingstone, T.J., Shen, N., Cooney, G.M., Jockenhoevel, S., Flanagan, T.C., O’Brien, F.J., “Freeze-Drying as a Novel Biofabrication Method for Achieving a Controlled Microarchitecture within Large, Complex Natural Biomaterial Scaffolds”, *Adv. Healthc. Mater.*, 6 (21), 1700598, (2017).

Brown, P.W., Martin, R.I., “An Analysis of Hydroxyapatite Surface Layer Formation”, *J. Phys. Chem. B*, 103 (10), 1671–1675, (1999).

Byrne, D.P., Lacroix, D., Prendergast, P.J., “Simulation of fracture healing in the tibia: Mechanoregulation of cell activity using a lattice modeling approach”, *J. Orthop. Res.*, 29 (10), 1496–1503, (2011).

Cannio, M., Bellucci, D., Roether, J.A., Boccaccini, Dino.N., Cannillo, V., “Bioactive Glass Applications: A Literature Review of Human Clinical Trials”, *Materials*, 14 (18), 5440, (2021).

Chandra, G., Pandey, A., “Biodegradable bone implants in orthopedic applications: a review”, *Biocybern. Biomed. Eng.*, 40 (2), 596–610, (2020).

Chen, F., Miao, Y., Ma, L., Zhan, F., Wang, W., Chen, N., Xie, Q., “Optimization of pore structure of a clayey diatomite”, *Part. Sci. Technol.*, 38 (5), 522–528, (2020).

Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., “Scaffold Design for Tissue Engineering”, *Macromol. Biosci.*, 2 (2), 67–77, (2002).

- Chen, J., Roether, A., Boccaccini, A., “Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials”, *Top Tissue Eng*, 4, (2008).
- Chen, Q.Z., Thompson, I.D., Boccaccini, A.R., “45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 27 (11), 2414–2425, (2006).
- Chen, Q.-Z., Thouas, G.A., “Fabrication and characterization of sol–gel derived 45S5 Bioglass®–ceramic scaffolds”, *Acta Biomater.*, 7 (10), 3616–3626, (2011).
- Chen, X., Guo, C., Zhao, N., “Preparation and characterization of the sol–gel nano-bioactive glasses modified by the coupling agent gamma-aminopropyltriethoxysilane”, *Appl. Surf. Sci.*, 255 (2), 466–468, (2008).
- Chiara, G., Letizia, F., Lorenzo, F., Edoardo, S., Diego, S., Stefano, S., Eriberto, B., Barbara, Z., “Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction”, *Int. J. Mol. Sci.*, 13 (1), 737–757, (2012).
- Claes, L., Recknagel, S., Ignatius, A., “Fracture healing under healthy and inflammatory conditions”, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 8 (3), 133–143, (2012).
- Cornell, C.N., Lane, J.M., “Current Understanding of Osteoconduction in Bone Regeneration”, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 355, S267, (1998).
- Cypher, T.J., Grossman, J.P., “Biological principles of bone graft healing”, *J. Foot Ankle Surg. Off. Publ. Am. Coll. Foot Ankle Surg.*, 35 (5), 413–417, (1996).
- Dang, T.H., Bui, T.H., Guseva, E.V., Ta, A.T., Nguyen, A.T., Hoang, T.T.H., Bui, X.V., “Characterization of Bioactive Glass Synthesized by Sol-Gel Process in Hot Water”, *Crystals*, 10 (6), 529, (2020).
- Danil de Namor, A.F., El Gamouz, A., Frangie, S., Martinez, V., Valiente, L., Webb, O.A., “Turning the volume down on heavy metals using tuned diatomite. A review of diatomite and modified diatomite for the extraction of heavy metals from water”, *J. Hazard. Mater.*, 241–242, 14–31, (2012).
- Dutta, R.C., Dey, M., Dutta, A.K., Basu, B., “Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering”, *Biotechnol. Adv.*, 35 (2), 240–250, (2017).
- Eivazzadeh-Keihan, R., Bahojb Noruzi, E., Khanmohammadi Chenab, K., Jafari, A., Radinekiyan, F., Hashemi, S.M., Ahmadpour, F., Behboudi, A., Mosafer, J., Mokhtarzadeh, A., Maleki, A., Hamblin, M.R., “Metal-based nanoparticles for bone tissue engineering”, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 14 (12), 1687–1714, (2020).

- ElHawary, H., Baradaran, A., Abi-Rafeh, J., Vorstenbosch, J., Xu, L., Efanov, J.I., “Bone Healing and Inflammation: Principles of Fracture and Repair”, *Semin. Plast. Surg.*, 35 (3), 198–203, (2021).
- Eltom, A., Zhong, G., Muhammad, A., “Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review”, *Adv. Mater. Sci. Eng.*, 2019, e3429527, (2019).
- Fattore, A.D., Teti, A., Rucci, N., “Bone cells and the mechanisms of bone remodelling”, *Front. Biosci.-Elite*, 4 (6), 2302–2321, (2012).
- Fernández-Hernán, J.P., Torres, B., López, A.J., Rams, J., “The Role of the Sol-Gel Synthesis Process in the Biomedical Field and Its Use to Enhance the Performance of Bioabsorbable Magnesium Implants”, *Gels*, 8 (7), 426, (2022).
- Filippi, M., Born, G., Chaaban, M., Scherberich, A., “Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 8, (2020).
- Fiume, E., Migneco, C., Verné, E., Baino, F., “Comparison between Bioactive Sol-Gel and Melt-Derived Glasses/Glass-Ceramics Based on the Multicomponent SiO₂-P₂O₅-CaO-MgO-Na₂O-K₂O System”, *Materials*, 13 (3), 540, (2020).
- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S., “Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells”, *BioMed Res. Int.*, 2015, 421746, (2015).
- Fu, W., Shu, Y., Yi, Z., Su, Y., Pan, Y., Zhang, F., Brynjolfsson, S., “Diatom morphology and adaptation: Current progress and potentials for sustainable development”, *Sustain. Horiz.*, 2, 100015, (2022).
- Fuhrmann, T., Landwehr, S., El Rharbi-Kucki, M., Sumper, M., “Diatoms as living photonic crystals”, *Appl. Phys. B*, 78 (3), 257–260, (2004).
- Gönenmiş, D.E., Özcan, Y., “Preparation of Diatom-Doped Bio-Nanocomposite Materials for Bone Tissue Scaffolds”, *Mater. Res.*, 25, e20220234, (2022).
- Hao, Z., Song, Z., Huang, J., Huang, K., Panetta, A., Gu, Z., Wu, J., “The scaffold microenvironment for stem cell based bone tissue engineering”, *Biomater. Sci.*, 5 (8), 1382–1392, (2017).
- Hassanpour, P., Panahi, Y., Ebrahimi-Kalan, A., Akbarzadeh, A., Davaran, S., Nasibova, A.N., Khalilov, R., Kavetsky, T., “Biomedical applications of aluminium oxide nanoparticles”, *Micro Nano Lett.*, 13 (9), 1227–1231, (2018).

- Hench, L.L., “The story of Bioglass®”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 17 (11), 967–978, (2006).
- Hoppe, A., Güldal, N.S., Boccaccini, A.R., “A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics”, *Biomaterials*, 32 (11), 2757–2774, (2011).
- Jamali, A.A., Akbari, F., Ghorakhlu, M.M., de la Guardia, M., Yari Khosroushahi, A., “Applications of Diatoms as Potential Microalgae in Nanobiotechnology”, *BioImpacts BI*, 2 (2), 83–89, (2012).
- Jones, J.R., “Review of bioactive glass: From Hench to hybrids”, *Acta Biomater.*, 9 (1), 4457–4486, (2013).
- Kam, O.R., Garikoe, I., Bakouan, C., Guel, B., “Low-Cost Synthesis of Alumina Nanoparticles and Their Usage for Bisphenol-A Removal from Aqueous Solutions”, *Processes*, 9 (10), 1709, (2021).
- Kaur, P., Khanna, A., Kaur, N., Nayar, P., Chen, B., “Synthesis and structural characterization of alumina nanoparticles”, *Phase Transit.*, 93 (6), 596–605, (2020).
- Kim, J.-M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M.B., Shim, J.-H., “Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis”, *Cells*, 9 (9), 2073, (2020).
- Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T., “Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 24 (6), 721–734, (1990).
- Leena, R.S., Vairamani, M., Selvamurugan, N., “Alginate/Gelatin scaffolds incorporated with Silibinin-loaded Chitosan nanoparticles for bone formation in vitro”, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 158, 308–318, (2017).
- Lemaire, V., Tobin, F.L., Greller, L.D., Cho, C.R., Suva, L.J., “Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling”, *J. Theor. Biol.*, 229 (3), 293–309, (2004).
- Li, R., Clark, A.E., Hench, L.L., “An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing”, *J. Appl. Biomater.*, 2 (4), 231–239, (1991).
- Li, Z., Wang, H., He, S., Lu, Y., Wang, M., “Investigations on the preparation and mechanical properties of the nano-alumina reinforced cement composite”, *Mater. Lett.*, 60 (3), 356–359, (2006).
- Liu, J., Miao, X., “Sol-gel derived bioglass as a coating material for porous alumina scaffolds”, *Ceram. Int.*, 30 (7), 1781–1785, (2004).

- Liu, Y., Manjubala, I., Schell, H., Epari, D.R., Roschger, P., Duda, G.N., Fratzl, P., “Size and habit of mineral particles in bone and mineralized callus during bone healing in sheep”, *J. Bone Miner. Res.*, 25 (9), 2029–2038, (2010).
- Liu, Y., Miao, Y.-L., Qin, F., Cao, C., Yu, X.-L., Wu, Y.-H., Wang, T.-L., Xu, R.-G., Zhao, L., Wu, F., Zhang, Z.-C., Yang, J.-M., Yang, Y., Xie, X., Zhang, L.-M., Deng, F.-L., “Electrospun Poly (Aspartic Acid)-Modified Zein Nanofibers for Promoting Bone Regeneration”, *Int. J. Nanomedicine*, 14, 9497–9512, (2019).
- Loh, Q.L., Choong, C., “Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size”, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 19 (6), 485–502, (2013).
- Loi, F., Córdova, L.A., Pajarinen, J., Lin, T., Yao, Z., Goodman, S.B., “Inflammation, fracture and bone repair”, *Bone*, 86, 119–130, (2016).
- Lopez, P.J., Desclés, J., Allen, A.E., Bowler, C., “Prospects in diatom research”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16 (2), 180–186, (2005).
- Losic, D., Mitchell, J.G., Voelcker, N.H., “Diatomaceous Lessons in Nanotechnology and Advanced Materials”, *Adv. Mater.*, 21 (29), 2947–2958, (2009).
- Manavitehrani, I., Le, T.Y.L., Daly, S., Wang, Y., Maitz, P.K., Schindeler, A., Dehghani, F., “Formation of porous biodegradable scaffolds based on poly(propylene carbonate) using gas foaming technology”, *Mater. Sci. Eng. C*, 96, 824–830, (2019).
- Manzini, B.M., Machado, L.M.R., Noritomi, P.Y., da Silva, J.V.L., “Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review”, *J. Biosci.*, 46 (1), 17, (2021).
- Mellon, S.J., Tanner, K.E., “Bone and its adaptation to mechanical loading: a review”, *Int. Mater. Rev.*, 57 (5), 235–255, (2012).
- Mitsak, A.G., Dunn, A.M., Hollister, S.J., “Mechanical characterization and non-linear elastic modeling of poly(glycerol sebacate) for soft tissue engineering”, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 11, 3–15, (2012).
- Mocquot, C., Attik, N., Pradelle-Plasse, N., Grosgeat, B., Colon, P., “Bioactivity assessment of bioactive glasses for dental applications: A critical review”, *Dent. Mater.*, 36 (9), 1116–1143, (2020).
- Moghanian, A., Nasiripour, S., Miri, Z., Hajifathali, Z., Hosseini, S.H., Sajjadnejad, M., Aghabarari, R., Nankali, N., Miri, A.K., Tahriri, M.,

“Structural and in vitro biological evaluation of sol-gel derived multifunctional Ti+4/Sr+2 co-doped bioactive glass with enhanced properties for bone healing”, *Ceram. Int.*, 47 (20), 29451–29462, (2021).

Murugan, R., Ramakrishna, S., “Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite”, *Biomaterials*, 25 (17), 3829–3835, (2004).

Mustafov, S.D., Sen, F., Seydibeyoglu, M.O., “Preparation and characterization of diatomite and hydroxyapatite reinforced porous polyurethane foam biocomposites”, *Sci. Rep.*, 10 (1), 13308, (2020).

Neščáková, Z., Zheng, K., Liverani, L., Nawaz, Q., Galusková, D., Kaňková, H., Michálek, M., Galusek, D., Boccaccini, A.R., “Multifunctional zinc ion doped sol – gel derived mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications”, *Bioact. Mater.*, 4, 312–321, (2019).

Ott, S.M., “Cortical or Trabecular Bone: What’s the Difference?”, *Am. J. Nephrol.*, 47 (6), 373–375, (2018).

Owji, H., Hemmati, S., Heidari, R., Hakimzadeh, M., “Effect of alumina (Al₂O₃) nanoparticles and macroparticles on *Trigonella foenum-graceum* L. in vitro cultures: assessment of growth parameters and oxidative stress-related responses”, *3 Biotech*, 9 (11), 419, (2019).

Oyane, A., Kim, H.-M., Furuya, T., Kokubo, T., Miyazaki, T., Nakamura, T., “Preparation and assessment of revised simulated body fluids”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 65A (2), 188–195, (2003).

Özcan, Y., Gönenmiş, D.E., Kızıllhan, E., Gök, C., “Highly Porous Biocomposite Scaffolds Fabricated by Chitosan/Alginate/Diatom for Tissue Engineering”, *Polym. Korea*, 46 (4), 455–462, (2022).

Palmero, P., “15 - Ceramic–polymer nanocomposites for bone-tissue regeneration”, In: H. Liu, ed. *Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration*. Oxford: Woodhead Publishing, 331–367, (2016).

Parkinson, J., Gordon, R., “Beyond micromachining: the potential of diatoms”, *Trends Biotechnol.*, 17 (5), 190–196, (1999).

Parsaei, M., Rojhani, M., Seyedahmadian, S., “Effect of the Addition of Nano Alumina on the Mechanical Properties of Clay”, *Geotech. Geol. Eng.*, 41 (6), 3767–3779, (2023).

- Pazzaglia, U.E., Congiu, T., Sibilgia, V., Quacci, D., “Osteoblast-osteocyte transformation. A SEM densitometric analysis of endosteal apposition in rabbit femur”, *J. Anat.*, 224 (2), 132–141, (2014).
- Peitl, O., Dutra Zanotto, E., Hench, L.L., “Highly bioactive P2O5–Na2O–CaO–SiO2 glass-ceramics”, *J. Non-Cryst. Solids*, 292 (1), 115–126, (2001).
- Pereira, H., Cengiz, I.F., Maia, F.R., Bartolomeu, F., Oliveira, J.M., Reis, R.L., Silva, F.S., “Physicochemical properties and cytocompatibility assessment of non-degradable scaffolds for bone tissue engineering applications”, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 112, 103997, (2020).
- Pirayesh, H., Nychka, J.A., “Sol–Gel Synthesis of Bioactive Glass-Ceramic 45S5 and its in vitro Dissolution and Mineralization Behavior”, *J. Am. Ceram. Soc.*, 96 (5), 1643–1650, (2013a).
- Ponzetti, M., Rucci, N., “Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics”, *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (13), 6651, (2021).
- Porter, J.R., Ruckh, T.T., Popat, K.C., “Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies”, *Biotechnol. Prog.*, 25 (6), 1539–1560, (2009).
- Rahaman, M.N., Brown, R.F., Bal, B.S., Day, D.E., “Bioactive Glasses for Nonbearing Applications in Total Joint Replacement”, *Semin. Arthroplasty*, 17 (3), 102–112, (2006).
- Rahaman, M.N., Day, D.E., Sonny Bal, B., Fu, Q., Jung, S.B., Bonewald, L.F., Tomsia, A.P., “Bioactive glass in tissue engineering”, *Acta Biomater.*, 7 (6), 2355–2373, (2011).
- Rahmati, M., Mozafari, M., “Biocompatibility of alumina-based biomaterials–A review”, *J. Cell. Physiol.*, 234 (4), 3321–3335, (2019).
- Rezaei, Y., Moztarzadeh, F., Shahabi, S., Tahriri, M., “Synthesis, Characterization, and In Vitro Bioactivity of Sol-Gel-Derived SiO2–CaO–P2O5–MgO–SrO Bioactive Glass”, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Met. Chem.*, 44 (5), 692–701, (2014).
- Reznikov, N., Shahar, R., Weiner, S., “Bone hierarchical structure in three dimensions”, *Acta Biomater.*, 10 (9), 3815–3826, (2014).
- Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccini, A.R., “Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 27 (18), 3413–3431, (2006).

- Rho, J.-Y., Kuhn-Spearing, L., Zioupos, P., “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone”, *Med. Eng. Phys.*, 20 (2), 92–102, (1998).
- Said, S., Mikhail, S., Riad, M., “Recent processes for the production of alumina nano-particles”, *Mater. Sci. Energy Technol.*, 3, 344–363, (2020).
- Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikkö, K., Väänänen, H.K., “Removal of Osteoclast Bone Resorption Products by Transcytosis”, *Science*, 276 (5310), 270–273, (1997).
- Saravanapavan, P., Jones, J.R., Pryce, R.S., Hench, L.L., “Bioactivity of gel–glass powders in the CaO-SiO₂ system: A comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O)”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 66A (1), 110–119, (2003).
- Schaffler, M.B., Cheung, W.-Y., Majeska, R., Kennedy, O., “Osteocytes: Master Orchestrators of Bone”, *Calcif. Tissue Int.*, 94 (1), 5–24, (2014).
- Schindeler, A., McDonald, M.M., Bokko, P., Little, D.G., “Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture”, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 19 (5), 459–466, (2008).
- Schmidt, A.H., “Autologous bone graft: Is it still the gold standard?”, *Injury*, 52, S18–S22, (2021).
- Sepulveda, P., Jones, J.R., Hench, L.L., “Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 58 (6), 734–740, (2001).
- Serra, I.R., Fradique, R., Vallejo, M.C.S., Correia, T.R., Miguel, S.P., Correia, I.J., “Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration”, *Mater. Sci. Eng. C*, 55, 592–604, (2015).
- Shearer, A., Montazerian, M., Mauro, J.C., “Modern definition of bioactive glasses and glass-ceramics”, *J. Non-Cryst. Solids*, 608, 122228, (2023).
- Sola, A., Bertacchini, J., D’Avella, D., Anselmi, L., Maraldi, T., Marmioli, S., Messori, M., “Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche”, *Mater. Sci. Eng. C*, 96, 153–165, (2019).
- Stevens, M.M., “Biomaterials for bone tissue engineering”, *Mater. Today*, 11 (5), 18–25, (2008).
- Suamte, L., Tirkey, A., Barman, J., Jayasekhar Babu, P., “Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications”, *Smart Mater. Manuf.*, 1, 100011, (2023).

- Sumper, M., Kröger, N., “Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins”, *J. Mater. Chem.*, 14 (14), 2059–2065, (2004).
- Tamburaci, S., Tihminlioglu, F., “Diatomite reinforced chitosan composite membrane as potential scaffold for guided bone regeneration”, *Mater. Sci. Eng. C*, 80, 222–231, (2017).
- Tamjid, E., Bohlouli, M., Mohammadi, S., Alipour, H., Nikkhah, M., “Sustainable drug release from highly porous and architecturally engineered composite scaffolds prepared by 3D printing”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 108 (6), 1426–1438, (2020).
- Tan, C.Y., Singh, R., Teh, Y.C., Tan, Y.M., Yap, B.K., “The Effects of Calcium-to-Phosphorus Ratio on the Densification and Mechanical Properties of Hydroxyapatite Ceramic”, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 12 (1), 223–227, (2015).
- Tang, W., Lin, D., Yu, Y., Niu, H., Guo, H., Yuan, Y., Liu, C., “Bioinspired trimodal macro/micro/nano-porous scaffolds loading rhBMP-2 for complete regeneration of critical size bone defect”, *Acta Biomater.*, 32, 309–323, (2016).
- Velasco, M.A., Narváez-Tovar, C.A., Garzón-Alvarado, D.A., “Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *BioMed Res. Int.*, 2015, e729076, (2015).
- Walters, G., Pountos, I., Giannoudis, P.V., “The cytokines and micro-environment of fracture haematoma: Current evidence”, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 12 (3), e1662–e1677, (2018).
- Wang, X., Schröder, H.C., Grebenjuk, V., Diehl-Seifert, B., Mailänder, V., Steffen, R., Schloßmacher, U., Müller, W.E.G., “The Marine Sponge-Derived Inorganic Polymers, Biosilica and Polyphosphate, as Morphogenetically Active Matrices/Scaffolds for the Differentiation of Human Multipotent Stromal Cells: Potential Application in 3D Printing and Distraction Osteogenesis”, *Mar. Drugs*, 12 (2), 1131–1147, (2014).
- Williams, D.F., “On the mechanisms of biocompatibility”, *Biomaterials*, 29 (20), 2941–2953, (2008).
- Xynos, I.D., Hukkanen, M.V.J., Batten, J.J., Buttery, L.D., Hench, L.L., Polak, J.M., “Bioglass ®45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering”, *Calcif. Tissue Int.*, 67 (4), 321–329, (2000).

Zafar, B., Mottaghitalab, F., Shahosseini, Z., Negahdari, B., Farokhi, M., “Silk fibroin/alumina nanoparticle scaffold using for osteogenic differentiation of rabbit adipose-derived stem cells”, *Materialia*, 9, 100518, (2020).

Zafar, M.S., Khurshid, Z., Almas, K., “Oral tissue engineering progress and challenges”, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 12 (6), 387–397, (2015).

Zheng, K., Boccaccini, A.R., “Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review”, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 249, 363–373, (2017).

Zhu, G., Zhang, T., Chen, M., Yao, K., Huang, X., Zhang, B., Li, Y., Liu, J., Wang, Y., Zhao, Z., “Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds”, *Bioact. Mater.*, 6 (11), 4110–4140, (2021).