

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOMİMETİK YÖNTEM İLE HİDROKSİAPATİT
SENTEZİ VE UYGULAMALARI**

DOKTORA TEZİ

Serbülent TÜRK

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mahmut ÖZACAR
Ortak Danışman : Prof. Dr. Cuma BİNDAL

Kasım 2020

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.



Serbüent TÜRK

13/11/2020

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteklerini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Mahmut ÖZACAR ve ortak danışman hocam Prof. Dr. Cuma BİNDAL'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince tezimi izleyerek fikirlerini paylaşan ve beraber tartışma ortamı oluşturan değerli hocalarım Prof. Dr. Sakin ZEYTİN ve Prof. Dr. Arif BARAN'a saygılarımı sunarım. Çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı Arş. Gör. Burak ÜNLÜ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Öğrenim hayatım boyunca yetişmemde emeği geçen Prof. Dr. Hülya İŞCAN, Öğrt. Zülfiye AKTÜRK ve Sn. Erkan ÇAKIRTEPE başta olmak üzere tüm öğretmenlerim ve hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2016-01-18-051, 2019-5-19-26, 2019-6-23-223) teşekkür ederim. Her zaman büyük desteğini gördüğüm ve başarılarımı borçlu olduğum beni sevgiyle büyüten annem Serpil TÜRK ve babam Orhan TÜRK'e teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana her zaman moral veren, destekçim ve yol arkadaşım sevgili eşim Mürvet TÜRK'e, çalışmalarımın birlikte büyüyen ve bana her zaman anlayış gösteren canım oğlum Arden TÜRK'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
TABLOLAR LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY	xx
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
BİYOMİMETİK YÖNTEMLE BİYOMALZEME ÜRETİMİ VE AKILLI İLAÇ DAĞITIM SİSTEMLERİ	4
2.1. Hidroksiapatit ve CaP Fazları.....	4
2.2. Biyomimetik Yöntem ve Yapay Vücut Sıvısı	9
2.3. Ti ve Ti6Al4V Yüzey işlemleri ve Biyomimetik Kaplama.....	12
2.4. Biyomimetik Yapı İskeleleri ve Biyomalzemelerde Kullanılan Bileşenler	17
2.5. Akıllı İlaç Dağıtım Sistemi ve Bileşenleri.....	20
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	23
3.2. Yöntem	25

3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	25
3.2.2. Numunelerin sentezi ve hazırlık aşamaları.....	26
3.2.2.1. Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak hidroksiapatitin mikrodalga destekli biyomimetik sentezi çalışması	26
3.2.2.2. GO indirgenmesinin HA ve TCP oluşumuna olan etkisi çalışması	29
3.2.2.3. Ti Üzerinde Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Oluşumunda Ön İşlemlerin Karşılaştırılması Çalışması	30
3.2.2.4. Kemik doku mühendisliği için 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA kompozit iskeleler çalışması.....	31
3.2.2.5. Yeni m-5xSBF’de monofazik brushitin Ti6Al4V üzerine biyomimetik yöntemle kaplaması çalışması	33
3.2.2.6. Çözelti ve kalsinasyon süresinin Sol-Jel Hidroksiapatit sentezi üzerine etkisi çalışması	34
3.2.2.7. Ag, Zn veya Co katkılı HA’nın biyomimetik sentezi ve fonksiyonel Ti üzerinde Ag, Zn veya Co katkılı HA/fMWCNT kompozitinin kaplanması çalışması.....	36
3.2.2.8. Kanser tedavisine yönelik uyarana duyarlı akıllı ilaç dağıtım sistemi olarak NCQDs bazlı enjekte edilebilir, kendiliğinden çapraz bağlanan ve yerinde oluşan yeni çok fonksiyonlu hidrojel çalışması	40
3.2.3. Karakterizasyon ve Testler	43
3.2.3.1. Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak hidroksiapatitin mikrodalga destekli biyomimetik sentezi çalışması	43
3.2.3.2. GO indirgenmesinin HA ve TCP oluşumuna olan etkisi çalışması	44
3.2.3.3. Ti üzerinde biyomimetik yöntemle hidroksiapatit oluşumunda ön yüzey işlemlerin karşılaştırılması çalışması.....	45
3.2.3.4. Kemik doku mühendisliği için 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA kompozit iskeleler çalışması.....	46

3.2.3.5. Yeni m-5xSBF’de monofazik brushitin Ti6Al4V üzerine biyomimetik yöntemle kaplaması çalışması	49
3.2.3.6. Çözelti ve kalsinasyon süresinin Sol-Jel Hidroksiapatit sentezi üzerine etkisi çalışması	50
3.2.3.7. Ag, Zn veya Co katkılı HA’nın biyomimetik sentezi ve fonksiyonel Ti üzerinde Ag, Zn veya Co katkılı HA/fMWCNT kompozitinin kaplanması çalışması.....	50
3.2.3.8. Kanser tedavisine yönelik uyarana duyarlı akıllı ilaç dağıtım sistemi olarak NCQDs bazlı enjekte edilebilir, kendiliğinden çapraz bağlanan ve yerinde oluşan yeni çok fonksiyonlu hidrojel çalışması	53

BÖLÜM 4.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA	59
4.1. Farklı Kalsiyum Kaynakları Kullanılarak Hidroksiapatitin Mikrodalga Destekli Biyomimetik Sentezi Çalışması.....	59
4.2. GO İndirgenmesinin HA ve TCP Oluşumuna Olan Etkisi Çalışması ...	65
4.3. Ti Üzerinde Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Oluşumunda Ön İşlemlerin Karşılaştırılması Çalışması.....	78
4.4. Kemik Doku Mühendisliği İçin 3B Gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA Kompozit İskeleler Çalışması	86
4.5. Yeni m-5xSBF’de Monofazik Brushitin Ti6Al4V Üzerine Biyomimetik Yöntemle Kaplaması Çalışması	102
4.6. Çözelti Ve Kalsinasyon Süresinin Sol-Jel Hidroksiapatit Sentezi Üzerine Etkisi Çalışması	116
4.7. Ag, Zn veya Co Katkılı HA’nın Biyomimetik Sentezi ve Fonksiyonel Ti Üzerinde Ag, Zn veya Co Katkılı HA/fMWCNT Kompozitinin Kaplanması Çalışması	123

4.8. Kanser Tedavisine Yönelik Uyarana Duyarlı Akıllı İlaç Dağıtım Sistemi Olarak NCQDs Bazlı Enjekte Edilebilir, Kendiliğinden Çapraz Bağlanan ve Yerinde Oluşan Yeni Çok Fonksiyonlu Hidrojel Çalışması	142
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

BÖLÜM 5.

GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER.....	172
--------------------------------------	-----

KAYNAKLAR	188
-----------------	-----

ÖZGEÇMİŞ	217
----------------	-----

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Derece santigrat
3B	: Üç boyutlu
Å	: Angström
Ağ.	: Ağırlık
APTES	: (3-aminopropil) trietoksisilan
Ark.	: Arkadaşları
At.	: Atomik
BCP	: Bifazik kalsiyum fosfat
BET	: Brauner-Emet-Teller
BJH	: Barrett-Joyner-Halenda
Ca	: Kalsiyum
CaO	: Kalsiyum oksit
CaP	: Kalsiyum fosfat
cm	: Santimetre
CNT	: Karbon nanotüp
Col	: Kolajen
CS	: Kitosan
Cu K α	: Bakır elementinin k kabuğundaki alfa ışıması
D	: Kristal büyüklüğü
DCPA	: Dikalsiyum fosfat
DDM	: Disk difüzyon yöntemi
DHT	: Dehidrotermal
DI	: Deiyonize
dk	: Dakika
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
Dox	: Dokсорubisin

DR	: İlaç salınımı
DST	: Dinamik arayüzey gerilimi
ECM	: Hücre dışı matris
EDS	: Enerji dağılım spektroskopisi
EIS	: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
EPR	: Geçirgenlik ve retansiyon etkisi
FESEM	: Alan emisyonlu-taramalı elektron mikroskobu
fMWCNT	: Fonksiyonel çok duvarlı karbon nanotüp
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
FWHM	: Pik yüksekliğinin yarı genişliği
g	: Gram
GO	: Grafen oksit
HA	: Hidroksiapatit
Hac.	: Hacim
HCl	: Hidroklorik asit
ICDD	: Uluslararası kırınım veri merkezi
I _D	: D-bant şiddeti
I _G	: G-bant şiddeti
kg	: Kilogram
kJ	: Kilojoule
kPa	: Kilopaskal
K _{sp}	: Çözünürlük çarpımı
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mN	: Milinewton
MSDDS	: Uyarılara duyarlı çok fonksiyonlu akıllı antikanser ilaç dağıtım sistemleri
MTT	: Metil tiyazolil tetrazolyum
mV	: Milivolt

n	: Formüldeki iyon sayısı
N ₂	: Azot gazı
NaCl	: Sodyum klorür
NCQDs	: Azot katkılı karbon kuantum dotlar
NH ₂	: Amin
nHA	: Nano hidroksiapatit
nm	: Nanometre
O	: Oksijen
OCP	: Oktakalsiyum fosfat
OH	: Hidroksil
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
R	: Evrensel gaz sabiti
RGO	: İndirgenmiş grafen oksit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Saat
S	: Süpersatürasyon oranı
SBF	: Yapay vücut sıvısı
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
Sn	: Saniye
T	: Mutlak sıcaklık
t	: Sıcaklık
TCP	: Trikalsiyum fosfat
TEM	: Tünellemeli elektron mikroskobu
TGA	: Termal gravimetrik analiz
Ti	: Titanyum
Tris	: Tris(hidroksimetil)-3-aminometan
UV-Vis	: Ultraviyole-Görünür bölge ışık absorpsiyon spektroskopisi
X _c	: Kristalinite
XPS	: X-ışınları fotoelektron spektroskopisi
XRD	: X-ışını kırınımı
Z	: Birim hücredeki molekül formül zamanı
α	: Alfa

β	: Beta
ΔG	: Gibbs serbest enerjisi
θ	: Bragg açısı
λ	: Dalga boyu
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
ρ	: Yoğunluk

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. NaOH ve HCl ön yüzey işlemleri sırasında Ti yüzeyinde kimyasal değişiklikler ve SBF'deki HA çekirdeklenmesi.	16
Şekil 3.1. Biyomimetik yöntemle kemik benzeri HA sentezinin akış şeması.	28
Şekil 3.2. Hidroksiapatit hazırlanışının akış şeması.	35
Şekil 4.1. Numune-1 (a), 2 (b), 3 (c) ve 4 (d) etiketli numunelerin SEM görüntüleri.	60
Şekil 4.2. Numune-1 (a), 2 (b) 3 (c) ve 4 (d) numunelerinin EDS analizi.	60
Şekil 4.3. Biyomimetik yöntemle sentezlenen numunelerin XRD analizleri.	61
Şekil 4.4. Numune-1 (a), 2 (b), 3 (c) ve 4 (d)'ün Raman spektrumları.....	64
Şekil 4.5. Numune-1 (a), 2 (b), 3 (c) ve 4 (d)'ün FTIR spektrumları.	65
Şekil 4.6. Boyut dağılım diyagramı ve GO'nun ortalama boyutu.	66
Şekil 4.7. GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin (a) biyomineralizasyon öncesi ve (b) sonrası SEM görüntüleri.	67
Şekil 4.8. Biyomineralizasyon sonrası GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun EDS alan analizi.	69
Şekil 4.9. Biyomineralizasyondan önce nötr pH'da GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin zeta potansiyelleri ve temas açıları.	69
Şekil 4.10. Hazırlanan GO, R1GO, R2GO ve R3GO (0,5 mg/mL) çözeltilerinin (a) öncesi ve (b) iki gün boyunca hareketsiz olduktan sonraki fotoğrafları.	71
Şekil 4.11. Biyomineralizasyon öncesi GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun Raman analizi.	71
Şekil 4.12. Biyomineralizasyondan önce GO GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.....	72
Şekil 4.13. Biyomineralizasyon öncesi ve sonrası GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun XRD analizi.	74

Şekil 4.14. GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin (a) biyomineralizasyondan önce ve (b) sonra FTIR spektrumları.....	74
Şekil 4.15. GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin (a) biyomineralizasyondan önce ve (b) sonraki TGA analizleri.....	76
Şekil 4.16. SBF’de biyomineralizasyon süreleri ile yüzeydeki HA/TCP çekirdeklenmesinin olası mekanizması (küresel şekiller HA/TCP çekirdeklenmesini temsil eder).....	77
Şekil 4.17. (a) NaOH (b), HCl ve (c) NaOH+HCl ile ön yüzey işleme tabi tutulmuş Ti numunelerinin 1 hafta SBF’de bekletilmesi sonrası; NaOH işleminden sonra (d) 2 ve (e) 4 hafta sonunda kaplama kalınlıkları.....	79
Şekil 4.18. SEM-EDS analizi ve dördüncü haftanın sonunda Ti plakasının kesitindeki elementlerin dağılım haritaları.....	80
Şekil 4.19. (a) NaOH, (b) HCl ve (c) NaOH+HCl ile ön yüzey işleme sonrası Ti numunelerinin 1,5xSBF’de ilk hafta sonundaki ve (d) dördüncü hafta sonunda kaplanan bifazik HA tozlarının EDS analizleri.....	81
Şekil 4.20. 1,5xSBF’de ilk hafta sonunda (a) NaOH, (b) HCl ve (c) NaOH+HCl ön yüzey işleme sonrası Ti numunelerinin XRD analizleri.....	82
Şekil 4.21. SBF içerisindeki NaOH, HCl ve NaOH+HCl işleme sonrası Ti numunelerinin (a) Nyquist grafiği, (b) $ Z $ vs. Frekans (c) Faz derecesi vs. Frekans Bode grafikleri.	83
Şekil 4.22. Sinterleme öncesi ve sonrası elde edilen bifazik HA tozunun (a,b) XRD, (c, d) Raman analizi, (e, f) FTIR ve (g, h) partikül boyutu ölçümü analizi.	84
Şekil 4.23. (a) FTIR spektrumları ile temas açıları, (b) fMWCNT’nin XRD paterni ve SEM görüntüsü, 3B gözenekli Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskelelerinin (c) biyomineralizasyon öncesi ve (d) biyomineralizasyon sonrası XRD modelleri.	87
Şekil 4.24. Üretilen iskelelerin (a) ve (b) biyomineralizasyon öncesi ve (c) biyomineralizasyon sonrası FTIR spektrumları.....	88

Şekil 4.25. Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskelelerinin (a) biyomineralizasyondan önce $\times 50$ ve (b) sonra $\times 1000$ SEM görüntüleri.	91
Şekil 4.26. Biyomimetik yöntemle kalsiyum ve fosfat çekirdeklenmesi ve 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS iskeleleri arasında önerilen hidrojen bağları.	93
Şekil 4.27. Üretilen yapı iskelelerinin (a), (c) biyomineralizasyon öncesi ve (b), (d) biyomineralizasyon sonrası basma gerilimi ve elastik modül sonuçları.	93
Şekil 4.28. Üretilen kompozit numunelerinin (a) biyomineralizasyon öncesi (b) biyomineralizasyon sonrası porozite, (c) biyomineralizasyon öncesi (d) biyomineralizasyon sonrası şişme, (e) biyomeniralizasyon sonrası TGA eğrileri ve (f) Col/fMWCNT/CS kompozit iskelesinin BET analizi.	98
Şekil 4.29. 1 ve 2 hafta sonra Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskelelerinin biyobozunma deneyi.	99
Şekil 4.30. Biyomineralizasyon öncesi ve sonrası üretilen iskelelerinin temas açıları.	100
Şekil 4.31. Üretilen 3B (a) Col, (b) CS, (c) Col/fMWCNT ve (d) Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerin optik mikroskop görüntüleri	100
Şekil 4.32. MTT analizi ile Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskelelerinin in-vitro biyoyumluluğu ve hücre çoğalması. Ortalama \pm SD (n = 3).	101
Şekil 4.33. (a) işlem görmemiş, (b) pürüzlendirilmiş ve (c) 24 saat 60°C'de 5M NaOH çözeltisi ile etcing sonrasındaki Ti6Al4V plakalarının SEM görüntüleri.	102
Şekil 4.34. İlk gün sonunda (a, b) m-5xSBF ve (c, d) 5xSBF içerisinde CaP ile çekirdeklenmiş Ti6Al4V yüzeylerinin SEM görüntüleri.....	103
Şekil 4.35. 2 gün sonra (a, b) m-5xSBF ve (c, d) 5xSBF içinde CaP ile kaplanmış Ti6Al4V'nin (a, b, c) SEM ve (d) FESEM görüntüsü.	104

Şekil 4.36. 2 gün sonunda (a) m-5xSBF ve (b) 5xSBF içinde kaplanmış CaP'ın EDS bölge analizi. Ek: EDS spektrumlarının elde edilmesi için kullanılan bölgelerin görüntüleri (kırmızı çerçeveler).....	105
Şekil 4.37. Ti6Al4V üzerinde CaP tabakaları ile bir araya getirilmiş çiçek benzeri hiyerarşik yapıların oluşturulması için şematik gösterim.	105
Şekil 4.38. İşlem görmemiş (Pristine), zımparalanmış (Polished), 60°C'de 24 saat boyunca 5M NaOH çözeltisi ile muamele edilmiş (Etched), m-5xSBF ve 5xSBF ile 2 gün sonrasında kaplanmış Ti6Al4V yüzeylerinin temas açıları.....	107
Şekil 4.39. (a) işlem görmemiş (Pristine) ve 60°C'de 24 saat boyunca 5M NaOH çözeltisi ile muamele edilmiş (Etched), (b) m-5xSBF ve 5xSBF ile 1 gün sonrasında çekirdeklenmiş ve (c) m-5xSBF ve 5xSBF ile 2 gün sonrasında kaplanmış Ti6Al4V yüzeylerin XRD paternleri.....	107
Şekil 4.40. m-5xSBF ve 5xSBF'de biyomineralizasyon sonrası sırasıyla brushit ve HA ile kaplanmış Ti6Al4V substrat yüzeylerinin FTIR spektrumları.....	111
Şekil 4.41. m-5xSBF ve 5xSBF'de biyomineralizasyon ile Ti6Al4V yüzeyine kaplanmış brushit ve HA tozlarının partikül boyut dağılımları.....	112
Şekil 4.42. m-5xSBF ve 5xSBF biyomimetik işlemleriyle Ti6Al4V üzerinde kaplanmış brushit ve HA kristallerinin TGA termogramı.....	114
Şekil 4.43. Sırasıyla m-5xSBF ve 5xSBF biyomimetik prosesleri ile Ti6Al4V yüzeyine kaplanmış (a) Brushit ve (b) HA tozlarının N ₂ adsorpsiyon-desorpsiyon izotermeleri.....	115
Şekil 4.44. Ti6Al4V üzerindeki kaplanmış brushit (siyah çizgi) ve HA (kırmızı çizgi) tozlarının sırasıyla m-5xSBF ve 5xSBF biyomimetik işlemleriyle (ν = gerilme, δ = bükülme) Raman spektrumları.....	115
Şekil 4.45. (a) HA1, (b) HA2, (c) HA3, (d) HA4, (e) HA5 ve (f) HA6'nın SEM görüntüleri.....	117
Şekil 4.46. (a) HA1, (b) HA2, (c) HA3, (d) HA4, (e) HA5 ve (f) HA6'nın EDS analizleri.....	118

Şekil 4.47. Su bazlı (a) HA1-HA3 ve etanol bazlı (b) HA4-HA6 tozları için X ışını kırınım desenleri.	119
Şekil 4.48. (a) HA1-HA3 ve (b) HA4-HA6'nın FTIR spektrumları.....	122
Şekil 4.49. Hem Ti'un silan ile hem de MWCNT'nin oksijen içeren fonksiyonel grupla fonksiyonellenmesinin, hazırlanan silanize edilmiş Ti yüzeyinde EDC ve NHS kullanılarak fMWCNT/Ag, Zn veya Co-katkılı HA kompozit kaplamanın sistematik çizimi.	124
Şekil 4.50. (a) HA, (b) Ag-HA, (c) Zn-HA ve (d) Co-HA numunelerinin SEM görüntüleri.	125
Şekil 4.51. Sentezlenen a) HA, b) Ag-HA, c) Zn-HA ve d) Co-HA tozlarının EDS spektrumu.....	127
Şekil 4.52. Sentezlenen HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın a) 10-90° aralığında genel ve b) 25-27° aralığındaki yakınlaştırılmış XRD spektrumları.	127
Şekil 4.53. HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın (a) FTIR ve (b) Raman spektrumları.	131
Şekil 4.54. (a) Parçacık boyut dağılımı, (b) Pelet daldırma süresine karşılık pH değişimi ve (c) TGA ile analiz edilen saf HA ve Ag, Zn, Co-HA malzemelerinin ısıl kararlılıkları.....	133
Şekil 4.55. Hazırlanan (a) fMWCNT/HA (b) fMWCNT/Ag-HA, (c) fMWCNT/Zn-HA ve (d) fMWCNT/Co-HA kompozitlerinin SEM görüntüleri.	135
Şekil 4.56. Silanize Ti substrat yüzeyinin (a) FTIR ve (b) EDS spektrumları.....	135
Şekil 4.57. MWCNT ve fMWCNT'nin FTIR spektrumları ve temas açıları.....	136
Şekil 4.58. Ön yüzey işlemi öncesi ve sonrası Ti yüzeylerinin XRD paternleri....	137
Şekil 4.59. (a) fMWCNT/HA (b) fMWCNT/Ag-HA, (c) fMWCNT/Zn-HA ve (d) fMWCNT/Co-HA kompozit kaplı Ti yüzeyinin SEM görüntüleri.	138
Şekil 4.60. Silanlanmış Ti substratları üzerindeki çapraz bağlanmamış ve çapraz bağlanmış kompozit kaplamaların yapışma dayanımı sonuçları	139

Şekil 4.61. Ti ve fMWCNT/Ag, Zn veya Co katkılı HA kompozit kaplı Ti yüzeylerinde ölçülen (a) Diiodometan, formamid ve su temas açıları ile (b) yüzey enerjileri.....	140
Şekil 4.62. HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın MTT analizi ile hücre değerlendirme sonuçları (n = 3).	141
Şekil 4.63. NCQDs'nin (a) TEM görüntüsü, (b) parçacık boyutu dağılımının histogramları, HA'nın (c) FESEM görüntüsü ve (d) EDS analizi.....	143
Şekil 4.64. (a) NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın FTIR spektrumları, (b) HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın XRD paternleri.	143
Şekil 4.65. (a) NCQDs'nin XPS spektrumu; (b – d) NCQDs'nin yüksek çözünürlüklü C 1s, O 1s ve N 1s spektrumları; (e) NCQDs/Dox'un XPS spektrumu; (f-g) NCQDs/Dox'un yüksek çözünürlüklü C1s ve N1s spektrumları; (h) NCQDs/Dox/HA'nın XPS spektrumu; (i, j) NCQDs/Dox/HA'nın yüksek çözünürlüklü Ca 2p ve P 2p spektrumları.	146
Şekil 4.66. Hazırlanan NCQD/Dox'ta (a) karbon, (b) oksijen ve (c) azotun elementel haritalaması, hazırlanan NCQDs/Dox/HA'da (d) karbon, (e) oksijen, (f) azot, (g) kalsiyum ve (h) fosforun elementel haritalaması.....	148
Şekil 4.67. (a) ζ HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA potansiyeli, (b) HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın hidrodinamik çapı, (c) sulu çözeltilerde HA, NCQDs, Dox, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın UV-Vis absorpsiyon spektrumu. Ek, gün ışığı altında (solda) ve 365 nm UV ışınıyla (sağda) ışınlanan NCQDs dispersiyonunun fotoğraflarını gösterir.	150
Şekil 4.68. Liyofilize hidrojellerin morfolojisi: (a-b) NCQDs'nin, (c-d) NCQDs/Dox ve (e-f) NCQDs/Dox/HA hidrojellerinin SEM görüntüleri.	152
Şekil 4.69. NCQD, NCQD/Dox ve NCQD/Dox/HA kombinasyonlarının jelleşme süreleri ve enjekte edilebilirliği.....	154

Şekil 4.70. (a) ve (d) sırasıyla pH 6,0 ve 4,3'te NCQDs çözeltisi; (b) ve (e) pH 6,0 ve 4,3'te sırasıyla NCQDs/Dox çözeltisi; (c) ve (f) pH 6,0 ve 4,3'te sırasıyla NCQDs/Dox/HA çözeltilerinin zamana bağlı dinamik arayüzey gerilimi ölçümleri.	158
Şekil 4.71. (a) HA, (b) NCQDs, (c) NCQDs/Dox ve (d) NCQDs/Dox/HA'nın agar plakasındaki <i>S. aureus</i> bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi. (e) HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın zamana karşı inhibisyon bölgesi değerlerindeki değişiklikler.....	161
Şekil 4.72. Dox'un (a) NCQDs/Dox ve (b) NCQDs/Dox/HA hidrojellerinden pH 7,4, 6,5, 5,5 ve 4,0'de in-vitro salınımı.....	163
Şekil 4.73. MCF-7 hücrelerinin (a) 24 saat boyunca pH 7,4 ve (b) 24 saat (siyah), 48 saat (kırmızı) ve 72 saat (mavi) için pH 6,5'daki canlılıkları.....	166
Şekil 4.74. Olası kendi kendine çapraz bağlanan kimyasal etkileşimler ile yerinde oluşturulan çok fonksiyonlu NCQDs/Dox/HA hibrit hidrojel ve tümör hücresi tarafından tetiklenen salınım mekanizması için şematik gösterim.....	167
Şekil 4.76. (a) 24 saatlik inkübasyondan sonra NCQDs'nin konsantrasyonunun L929 ve MCF-7 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi (n = 3). (b) L929 ve MCF-7 hücre hatlarında 1 saat boyunca kültürlenmiş NCQDs'nin (1 µg/mL) DAPI (Mavi), GFP (Yeşil) ve RFP (Kırmızı) görüntüleri. Ölçek çubuğu = 200 µm.	170
Şekil 4.77. MTT ile ölçülen inkübasyondan sonra hücre canlılığı. n = 3 ± SD.....	171

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Çeşitli CaP biyoseramiklerinin Ca/P atomik oranları.....	5
Tablo 3.1. 1,5xSBF ve kan plazmasındaki iyon konsantrasyonları.	27
Tablo 3.2. Numunelerin isimlendirilmeleri ile Ca ve P kaynakları.	27
Tablo 3.3. Kullanılan 1,5xSBF çözeltisi için kullanılan kimyasallar ve miktarları	31
Tablo 3.4. İnsan kan plazması (HBP), normal SBF, kullanılan 5xSBF ve m-5xSBF çözeltilerinin iyon konsantrasyonları (mM).....	33
Tablo 3.5. Hazırlanan SBF, 1,5xSBF ve c1,5xSBF ortamlarındaki iyon konsantrasyonları.....	36
Tablo 3.6. Hazırlanan hidrojel numunelerinin formülasyonları.....	41
Tablo 4.1. Numune-1 (a), 2 (b) 3 (c) ve 4 (d) numunelerinin atomik ve ağırlıkça EDS analizleri ve Ca/P atomik oranları.....	61
Tablo 4.2. XRD paternlerinden elde edilen latis parametreleri ve kristal boyutlar	62
Tablo 4.3. HA numunesinin sinterleme öncesi ve sonrası kristaliniteleri ve kristal boyutları.....	85
Tablo 4.4. Üretilen yapı iskelelerindeki Col, CS ve HA'nın FTIR analizleri.....	89
Tablo 4.5. Biyomineralizasyon öncesi ve sonrası 3B gözenekli Col, Cs, Col/fMWCNT, Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerinin mekanik özellikleri.....	94
Tablo 4.6. XRD paternlerinden elde edilen HA ve brushite ait kristal büyüklikleri ve kafes parametreleri.	109
Tablo 4.7. HA1-HA6 numunelerinin EDS analizi.	118
Tablo 4.8. XRD paternlerinden elde edilen HA1-HA6 numunelerinin kafes parametreleri ve kristal boyutları.....	120
Tablo 4.9. Biyomimetik sentezlenen HA, Ag-HA Zn-HA ve Co-HA tozlarının elementel bileşimleri.....	127

Tablo 4.10. XRD desenleriyle yansıtılan HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın kristalin boyutları ve kafes parametreleri.	129
Tablo 4.11. Titanyumun farklı yüzeylerinin temas açıları ile yüzey enerjileri.	140
Tablo 4.12. Güncel literatürde bazı pH'a duyarlı ve Dox taşınan akıllı ilaç dağıtım sistemlerinin karşılaştırılması ve özeti.	169

ÖZET

Anahtar kelimeler: Biyomimetik Yöntem, Hidroksiapatit, Biyomalzeme Kaplama, Yapay Vücut Sıvısı, Kalsiyum-Fosfat, 3B Poroz Yapı İskelesi, Biyomineralizasyon, Akıllı İlaç Dağıtım Sistemi

Bu çalışmada yapay vücut sıvısı (SBF) kullanılarak hidroksiapatit (HA) ve Kalsiyum-Fosfat (CaP) fazları biyomimetik yöntem ile biyomineralizasyon sonucu toz halde, indirgenmiş grafen oksit üzerinde, farklı ön yüzey işlemlerden geçirilmiş Titanyum yüzeyinde, liyofilizasyon ile oluşturulmuş olan 3B gözenekli kolajen/fonksiyonellendirilmiş çoklu duvarlı karbon nanotüp/kitosan yapı iskelesi üzerinde ve Ti6Al4V alaşımı üzerinde sentezlenmiştir. Sentez yönteminin kıyaslamasının yapılması için ayrıca sol-jel ile de HA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunlara ilaveten biyomimetik yöntemle Ag, Zn veya Co katkılı HA sentezi ve ardından fonksiyonellendirilmiş Ti üzerinde Ag, Zn veya Co katkılı HA/fMWCNT kompozitinin kaplanması gerçekleştirilmiştir. Son olarak ilaç taşıyıcı sistem olan NCQDs/Dox/HA hidrojelini geliştirilmiştir.

Sentezlenen HA, trikalsium fosfat (TCP), brushit, indirgenmiş grafen oksit, ön yüzey işlemleri sonrası Ti ve Ti6Al4V, fonksiyonellendirilmiş karbon nanotüp, Ag, Zn veya Co katkılı HA, fonksiyonellendirilmiş Ti, Azot katkılı karbon kuantum noktalar, kaplamalar, 3 Boyutlu Gözenekli yapı iskeleler ve hazırlanan hidrojellerin karakterizasyonları, yapılar arasındaki etkileşimleri ile incelemeleri XRD, SEM, FESEM, TEM, Raman ve FTIR spektrofotometresi, zeta potansiyeli, DLS, TGA, EDS, XPS, EIS, BET, UV-Vis, optik mikroskop, MTT, temas açısı, yüzey enerjisi, basma testi, yapışma testi, jelleşme süresi, enjekte edilebilirlik, DST ölçümleri, antibakteriyel aktivite, normal ve kanserli hücreler üzerinde ilaç salınımı ölçümü, biyogörüntüleme ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda, farklı morfolojilere sahip biyomimetik HA'nın, farklı Ca kaynağı ile SBF'de mikrodalga destekli biyomimetik yöntem kullanılarak sentezlenebileceği; GO biyomineralizasyonunun indirgenme oranı değiştirilmesi ile hızlandırılabilirliği; Ti yüzeyinin HA kaplanmasında farklı ön yüzey işlemlerinin kaplama sürecine farklı etki ettiği; Col/fMWCNT/CS/HA 3B gözenekli kemik iskelesinin süngerimsi kemik için uygun olduğu; CaP fazı olup kemik oluşumunda öncü olan brushit fazının SBF'nin modifiyesi ile biyomimetik koşullarda mümkün olduğu; çözelti ortamının sol-jel metodu ile sentezlenen HA özelliklerine etkideği; Ag, Zn veya Co katkılı HA'nın biyomimetik sentezinin mümkün olduğu ve Ti yüzeyinin fonksiyonellendirilmesinin Ag, Zn veya Co katkılı HA/fMWCNT kompoziti ile etkileşimlerini arttırdığı; HA katkılı üretilen NCQDs/Dox/HA hidrojelinin in-vivo akıllı ilaç dağıtım sistemi olarak kullanılması açısından ümit vaat ettiği bulunmuştur.

HYDROXYAPATITE SYNTHESIS BY BIOMIMETIC METHOD AND APPLICATIONS

SUMMARY

Keywords: Biomimetic Method, Hydroxyapatite, Biomaterial Coating, Artificial Body Fluid, Calcium-Phosphate, 3D Porous Scaffold, Biomineralization, Smart Drug Delivery System

In this study, hydroxyapatite (HA) and Calcium-Phosphate (CaP) phases using biomimetic method using biomimetic method, powdered, 3D porous collagen/functionalized multi-walled carbon nanotube/chitosan on the reduced graphene oxide on Titanium surface that has undergone different pretreatment. synthesized on Ti6Al4V alloy on scaffold. Hydroxyapatite synthesis was also performed with sol-gel to compare the synthesis method. In addition to these, synthesis of Ag, Zn or Co doped HA by biomimetic method and then coating of functionalized Ti with Ag, Zn or Co doped HA/fMWCNT composite was performed. Finally, the drug delivery system NCQDs/Dox/HA hydrogel was developed.

Synthesized hydroxyapatite, tricalcium phosphate, brushit, reduced graphene oxide, Ti and Ti6Al4V after pre-surface treatments, functionalized carbon nanotube, Ag, Zn or Co doped HA, functionalized Ti, Nitrogen doped carbon quantum dots; Characterization, interactions and examinations of the coatings and 3 dimensional porous scaffolds, hydrogels prepared, XRD, SEM, FESEM, TEM, Raman and FTIR spectrophotometry, zeta potential, DLS, TGA, EDS, XPS, EIS, BET, UV-Vis, optical microscope, MTT, contact angle, surface energy, compression and adhesion test, gelling time, injectability, DST measurements, antibacterial activity, drug release measurement on normal and cancerous cells and bioimaging measurements. As a result of the studies, biomimetic HA with different morphologies can be synthesized by using microwave assisted biomimetic method in SBF with different Ca source; biomineralization of GO can be accelerated by changing the reduction rate; in the HA coating of Ti surface, different front surface processes have different effects on the coating process; Col/fMWCNT/CS/HA 3D porous bone scaffold is suitable for spongy bone; a CaP phase and the brushit phase leading to bone formation are possible in biomimetic conditions with the modification of SBF; the solution ratio of HA produced by sol-gel method affects the synthesized HA properties; biomimetic synthesis of Ag, Zn or Co doped HA is possible, and functionalization of Ti surface increases interactions with Ag, Zn or Co doped HA/fMWCNT composite; it has been found that NCQDs/Dox/HA hydrogel produced with HA additives promises to be used as an in-vivo smart drug delivery system.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Biyomedikal alanında da olduğu gibi birçok alanda doğayı taklit etmek insan yaşamını kolaylaştırmakta ve teknolojik olarak gelişim sağlamaktadır. Bu nedenden dolayı biyomimetik konusu dikkat çeken bir yerde olmaya geniş yelpazedeki alanlarda devam etmektedir. Biyomedikal alanında ayrıca bir kalsiyum fosfat (CaP) fazı olan hidroksiapatit (HA) kemik içeriğinde olan inorganik fazı oluşturması, biyoyumluluğu ve kemik hücresi gelişimini desteklemesinden dolayı araştırmacıların dikkatini çekmektedir. HA sentezi için çeşitli sentez metotları olmasına rağmen biyolojik koşullardaki yapay vücut sıvısı (SBF) içeriğinde olan iyon konsantrasyonlarını, pH'ı ve sıcaklığı taklit eden tek yöntem biyomimetik yöntemdir. Bu yöntem bazı literatür kaynaklarında biyomineralizasyon olarak da geçmektedir.

Biyomimetik yöntemin temeli oluşum entalpisi en düşük olan CaP fazının oluşmasına dayanmaktadır. Doğal olarak iyon konsantrasyonu değiştirmesi ile aynı zamanda elde edilecek olan CaP fazı değiştirilebilir. Biyomedikal alanda dikkat çeken diğer CaP fazları ise brushit ve trikalsiyum fosfattır (TCP). Başlıca nedenler olarak; brushit fazı kemik oluşumunda öncü faz, TCP ise HA ile oluşturulan kompozitlerinin biyobozunma ayarlanmasında kolaylık sağlanmasından dolayı dikkat çekmektedir.

Biyomedikal alanında kullanılan Titanyum (Ti) ve alaşımı olan Ti6Al4V mekanik özelliklerinin kemiğe benzer olmasından dolayı tercih edilmektedir. Fakat Ti ve Ti6Al4V yüzeylerinin biyoyumlu hale getirilmeleri gereklidir ve biyomedikal alanında zorunlu hale gelmektedir. HA ve HA içerikli kompozitler Ti ve Ti6Al4V yüzeylerinin biyoyumluluğunu arttırmak için kaplama olarak kullanılmakta ve daha yüksek biyoyumlulukla birlikte biyoaktivite de elde edilmektedir. Ayrıca kaplamaların adezyonunun artırılması biyomedikal alanında kullanılan alt malzemeler söz konusu olduğunda önemli bir yere sahiptir.

Süngerimsi kemiğin kompakt kemiğe kıyasla mekanik özellikleri daha düşük olduğundan dolayı Ti ve Ti6Al4V'dan ziyade mekanik dayanımı düşük yapılara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alanda da HA dikkat çekici bir kompozit ilavesi olarak literatürde güncelliğini korumaya devam etmektedir. Süngerimsi kemik benzeri 3 boyutlu (3B) yapı iskeleleri özellikle içeriğinde eklenebilen biyolojik içeriklerin sıcaklıkla yapılarını koruyamamalarından dolayı liyofilizasyonla üretim avantaj sunmaktadır. Süngerimsi kemiğin poroz yapısı liyofilizasyon sonucu gözeneklilik elde edilerek taklit edilebildiği için liyofilizasyon tekniğinin kullanılması ayrıca bir avantaj sağlamaktadır.

Saf HA ile kıyaslandığında iyon katkılı HA'nın mikrobiyal aktivite, osteoblast aktivitesi ve kemiğin geri kazanımı farklılıkları gibi üstünlüklerinin oldukları bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı saf HA ile birlikte Gümüş, Çinko veya Kobalt katkılı HA malzemeleri aynı zamanda literatürde dikkat çekici bir yer almaktadır.

Süngerimsi kemik ve biyomalzeme kaplamaları saf HA ile birlikte kullanılan çeşitli bileşenler sayesinde istenilen özelliklere yaklaşmak adına geliştirilebilmektedir. İnorganik yapıyı oluşturan CaP fazının yanı sıra kemiğin organik yapısı büyük oranda Kolajen (Col)'den meydana gelmektedir. Vücut içerisinde bulunması biyolojik açıdan Col'ü biyouyumlu kılmakta ve biyomedikal alanında önemli bir kompozit bileşeni haline getirmektedir. Col sıcaklık ile yapısı bozulan bir biyolojik malzeme olduğundan dondurarak kurutma ile kompozit içerisinde işleme sokulabilmektedir. Col'e ilaveten bir diğer kompozit özelliklerini geliştiren katkı malzemesi olarak çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) verilebilir. Biyomedikal kaplamaları güçlendirmeleri, yüksek yüzey alanları ve biyouyumluluk özelliklerinden dolayı MWCNT dikkat çekici bir katkı malzemesi olarak bulunmaktadır. Fonksiyonellendirilme özelliklerinden dolayı kompozit içerisinde bağ yapmış olarak bulunabileceği ve yüzey alanlarının yüksek oluşu kompozitin birbirleri ile olan bağları arttırabileceği ayrıca da toksisitenin azaltılmasının sağlandığı bilinmektedir. Bir başka katkı malzemesi olarak Kitosan (CS) antibakteriyel doğası, yara iyileştirici aktivitesi ve yapısal olarak kıkırdak kemiğin ECM'sinin (hücre dışı matris) ana bileşeni olan glikozaminoglikanlara

benzeyen ve toksik olmayan biyopolimer olmasından dolayı dikkat çekici bir kompozit katkı malzemesidir.

İmplant malzemesi kaplanması ve süngerimsi kemik yerine geçebilecek 3B gözenekli yapı iskeleleri uygulamaları ile birlikte HA'nın içerisinde olduğu ve gelişmekte olan bir diğer konu da kanser tedavilerinde kullanılan akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Akıllı ilaç taşıyıcı sistemler vücut içerisindeki hedeflenen yerlere iletmek üzere ilaca karşı afinitesi olan ve hedeflenmiş olan yerin pH veya sıcaklık gibi dış uyarılara karşı ilaç salınımını gerçekleştiren sistemlerdir. Doksorubisin (Dox) en yaygın kullanılan geniş spektrumlu bir antikanser ilacı olması ile birlikte Dox'un intravenöz kemoterapisi sıklıkla sistemik toksisiteye ve ciddi komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle, toksik yan etkileri en aza indirmek ve antikanser etkinliğini arttırmak için Dox için çeşitli akıllı ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmektedir. Böylece akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerdeki ilaç salınımının pH gibi dış etkenlere karşı duyarlı olması hedeflenebilir. Bu sistemler içerisinde hidrojeller hem vücut içerisine enjekte edilebilirliklerinden dolayı hem de yerinde oluşan (in-situ) jelleşme şeklinde ayarlanabilen yapıları nedeni ile güncelliğini korumaktadır. Akıllı ilaç taşıyıcı sistemleri aynı zamanda Azot katkılı karbon kuantum noktalar (NCQDs) gibi son yıllarda dünya çapında birçok araştırma grubu tarafından yeni nesil çok işlevli nanotıp araştırma alanı olarak gün geçtikçe daha fazla ilgi çekmeye devam eden bir katkı malzemesi kullanılması ile yapının çok fonksiyonlu hale getirilebilmesi mümkündür.

Bu tez çalışmasının amacı, tez kapsamında gerçekleştirilen yayınlarda da bahsedildiği [1–7] ve ayrıca tezin içeriğinde var olan akıllı ilaç taşıyıcı sistemini de içine alan bir konu olan HA'nın uygulama alanlarına faydalı eklemeler gerçekleştirebilmek ve literatüre etki değeri yüksek bir zenginlik katabilmektir. Bu bağlamda tez içeriğinde tek çatı altında toplanmış olan ilgili çalışmalar ayrıca sonraki bölümlerde neden-sonuç ilişkileri ile ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

BÖLÜM 2. BİYOMİMETİK YÖNTEMLE BİYOMALZEME ÜRETİMİ VE AKILLI İLAÇ DAĞITIM SİSTEMLERİ

2.1. Hidroksiapatit ve CaP Fazları

CaP gibi biyoseramikler insan vücudunun hastalıklı veya hasar görmüş kısımlarını tamir ettiği ve insan yaşam kalitesini ve süresini arttırdığı için diş ve ortopedik uygulamalarda geniş ölçüde çalışılmaktadır. CaP fazlarından biri olan HA [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], insan doğal kemiğinin inorganik fazına kimyasal ve yapısal benzerliği nedeniyle biyoaktif seramik kategorisine girer ve biyomedikal alanda kompozitler, tozlar veya metalik biyomalzemeler üzerine kaplamalar olarak tıbbi uygulamalarda yoğun olarak incelenmiş olan bir biyoseramik malzemedir [6]. HA çevresindeki doku ile kimyasal olarak bağlanabilme ve etkileşime girebilme nedeniyle osteokondüktif, biyoaktif ve biyouyumlu özellikte bir seramiktir [8–10]. Yüksek osteokondüktivitesi nedeniyle sert doku malzemesi olarak çalışılmış ve klinik olarak dental implant materyali, kemik ikameleri, yapay kemik grefti ve osteokondüktif iskeleler olarak kullanılmaktadır [11, 12]. Nano boyutlu HA seramik biyomalzemeleri mikron boyutlarındakilere göre çok daha yüksek biyoaktivite [13, 14] ve geliştirilmiş biyobozunurluk [15, 16] göstermektedir. Nano boyutlu HA'dan Ca^{2+} salınımı doğal apatitinkine benzerdir ve ayrıca mikron boyutta olan HA'dan olan salınımına kıyasla daha hızlıdır [17]. Tablo 2.1. HA sentezi sırasında faz olarak en sık görülen CaP tuzlarını göstermektedir [18].

Oksijen (O) ve kalsiyum (Ca) atomlarının ekseni kafes sabitleri $a=0,9418$ nm ve $c=0,6884$ nm olan altıgen eksene paraleldir ve stokiyometrik HA'nın [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] altıgen yapısını oluşturur. Ayrıca, Ca eksikliği bulunan HA [CDHA, $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$, $0 \leq x \leq 1$] Ca/P oranı insan kemiğindeki oran olan 1,5'e yakın olduğu için insan kemiğine daha benzerdir [19]. İnsan sert dokusuyla benzer yapıya ve aynı kimyasal bileşime sahip olan CDHA'nın kemik oluşumu ve

yeniden yapılanma gibi çeşitli işlemlerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte kemikteki HA minerali yaklaşık 1,5 olan bir Ca/P oranına sahip olan bir CDHA yapısına sahiptir ve bu açıkça TCP'larla aynı Ca/P oranıdır (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca/P=1,5), ancak kimyasal ve yapısal bileşimi ise stokiometrik HA ile aynıdır (Ca/P=1,67) [20].

Tablo 2.1. Çeşitli CaP biyoseramiklerinin Ca/P atomik oranları [18].

Kalsiyum-fosfat	Sembol	Formül	Ca/P
Monokalsiyum fosfat monohidrat	(MCPM)/(MCPH)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Monokalsiyum fosfat anhidrat	(MCPA)/(MCP)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5
Dikalsiyum fosfat dihidrat (Brushit)	(DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Dikalsiyum fosfat anhidrat (Monetit)	(DCPA)/(DCP)	CaHPO_4	1,0
Oktakalsiyum fosfat	(OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
α -Trikalsiyum fosfat	(α -TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
β -Trikalsiyum fosfat	(β -TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Amorf kalsiyum fosfat	(ACP)	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,2-2,2
Hidroksiapatit	(HA)/(HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67

Daha etkin kemik yenilenme yeteneği, kontrol edilebilir biyobozunma oranı, mükemmel biyoaktivite, biyoyumluluk, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon yeteneğine sahip HA ve TCP'dan oluşan bifazik HA/TCP tıpta kemik grefti yerine yaygın olarak kullanılmaktadır ve kemik kusurlarının onarımını destekleyerek kemik dokusuna bağlanan mükemmel bir implant biyomalzemesidir [21–29]. Bununla birlikte, HA/TCP gibi seramik fazların mekanik özellikleri büyük kemik kusurları [30], majör uzun süreli ve yük taşıyıcı implant uygulamaları için yetersizdir [31]. HA/TCP'nin zayıf aşınma direnci, ortopedik implantlarda uygulanması için bir diğer dezavantajdır [32].

TCP ve HA, biyoaktivite ve biyobozunma gibi mükemmel özellikleri nedeniyle CaP biyomalzemeleri sınıfında en çok kullanılanlar arasındadır. HA ve TCP fazlarının kombinasyonu tek faza göre şu şekilde birkaç olumlu duruma sahiptir: (1) α -TCP/HA'nın daha yüksek mekanik özellikleri; (2) α -TCP/HA ve/veya β -TCP/HA'nın (biyolojik aktivite, biyobozunma ve biyomateryal ve dokular arasındaki etkileşim) daha iyi biyolojik özellikleri ve (3) kemik mineraline benzer olarak ayarlanabilen çeşitli kimyasal bileşimler (1,50-1,67 arası Ca/P oranları) [26, 33, 34].

İnsan kemikleri ve birçok HA içerikli biyoseramik aslında ~%25 β -TCP ve ~%75 HA'nın bir karışımıdır ve saf HA'ya daha iyi biyobozunurluk gösterirler [35]. HA ve β -TCP, genellikle iyi osteogenesis özellikleri nedeniyle kullanılır ve doğal kemik dokuları ile sıkı bağlar oluştururlar. Ayrıca, β -TCP'nin biyobozunma oranı HA'ninkinden on katından daha yüksektir. Bu, kontrol edilebilir biyobozunma oranı ve daha iyi kemik yenileme yeteneği nedeniyle HA/ β -TCP bifazik kalsiyum fosfat (BCP) seramiklerinin gelişmesine olan ilginin artmasını sağlamıştır [28, 36].

Yeni kemik osteogenezinin geliştirilmesi için kullanılabilen CaP biyomalzemelerinden biri olan brushit kırık kemik ve böbrek taşlarında tespit edilmiştir. Patolojik kalsifikasyon formunda insan metabolizmasında bulunan ve uzun vadede iltihaplanmaya neden olmayan brushit, mükemmel biyoyumluluk ile vücut ortamında ideal bir biyoemilim oranı sergilemektedir. Bu biyoemilim oranı yeni kemik oluşumuna yakın olup brushit kemik ikame maddesi olarak Ti alaşımları yüzeylerinde biyoaktif tabaka oluşturmak için başarıyla uygulanmıştır. İn-vivo ve in-vitro çalışmalar brushitin osteokondüktif, osteoindüktif, biyobozunur ve biyoyumlu olduğunu ayrıca kemik yenilenme süreçleri için potansiyel biyomalzeme olarak dikkat çektiği gösterilmiştir [37]. HA'nın çözünürlüğü (25°C'de 116,8 pK_{sp}), brushit ile (25°C'de 6,59 pK_{sp}) karşılaştırıldığında daha düşüktür. Brushit, diğer CaP'lara göre daha düşük yüzey enerjisine sahiptir ve vücut ortamında çözünebilirlik ile yüksek bir yüzey alanına sahip olma yetenekleri nedeniyle HA'ya göre benzersiz bir avantaja sahiptir. İmplantasyondan sonra brushitin hücrel aktivite sayesinde hızlı bir şekilde emilmesi ve ilk haftalarda çözünmeye uğraması göz önüne alındığında, bu özellikler diğer CaP'lara kıyasla önemli bir avantaj olarak görünmektedir. Ayrıca, implantasyonun erken dönemlerinde implant-doku ara yüzünün yanında artan Ca²⁺ ve fosfat (PO₄³⁻) iyon derişimleri sağlayabilir ve bu şekilde daha az çözünür olan HA'ya dönüşme elde edilebilir [38].

Gençlerdeki kemik dokusu yetişkinlere göre daha fazla brushit içerdiğinden gençlerdeki kemik dokusu yetişkinlere göre kendini iki kat daha hızlı yenileyebilmektedir. Bu nedenle, brushit kemik iyileşme reaksiyonunu taklit ederek

hızlı bir kemik yenilenmesinin olması için biyomalzeme olarak dikkat çekmektedir [39].

Brushit biyoseramik yüzeylerin in-vitro osteoblast aktivitelerini uyarmaktadır ve in-vivo osteoblast çeşitliliği biyoseramik yüzeyinin kemik büyüme hızına benzer çözünme oranında (20 $\mu\text{M}/\text{gün}$) çözünmesiyle oluşur. Bu süreç implantasyondan sonraki ilk haftalarda yeni oluşan kemik ve biyoseramik arasındaki fiziksel boşluğa neden olur. Bu süreci kemiğin yeniden şekillenmesi sağlayan kemik yüzeyinden materyale doğru olan merkezci trabeküler izler. HA'ya dönüşüm nedeniyle sonraki aşamalarda brushit biyoemilim hızı yavaşlar ve CaP biyoseramiğinin dış kenarları ile doğrudan temas halinde olan yeni kemik oluşur. Bu süreç biyoseramiğin osteointegrasyonu ve daha sonraki adımda da kemiğin yeniden şekillenmesi ile sonuçlanır. Bununla birlikte, mekanik dayanıklılığında ödün vermeden yeni kemik oluşumu için gerekli alanı oluşturduğundan in-vivo brushit biyoemilimi implante edilmiş bölgedeki kemik oluşumu açısından önemli bir özelliktir. Bu nedenle, brushit kullanıldığındaki yenilenen kemik miktarı genellikle, HA gibi emilemeyen fazlar kullanıldığında yenilenen kemik miktarından daha fazladır. HA fizyolojik pH'ta termodinamik olarak daha stabil faz olup HA ve brushitin her büyüme ünitesi başına olan çözünürlükleri sırası ile $4,8 \times 10^{-4}$ ve $3,04 \times 10^{-7}$ 'dir [40].

Saf stokiyometrik HA'nın aksine kemikteki biyolojik apatitler zayıf kristalli olup nonstokiyometriktir ve çoğu zaman HA kristal yapısında iyonik ilaveler içerir. Bu nedenle, bileşimi $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ olan karakteristik HA stokiyometrisinden uzaktır [41, 42]. Hücre farklılaşmasını teşvik etme, kemik oluşumu sırasında hücre çoğalma ve bağlanma gibi biyolojik aktivitelerini arttırmak ve doğal kemikteki biyolojik apatitlere benzer sentetik HA yapmak için iyonik yerdeğiştirmeler uygulanmaktadır [43–45]. İz elementleri in-vivo ve in-vitro olarak kemik mineralleri ile kemik hücreleri üzerindeki dolaylı veya doğrudan etkileri nedeniyle kemik emilimini ve oluşumunu hızlandırmaktadırlar [46, 47].

HA, birim hücre başına 44 atom içeren $\text{P6}_3/\text{m}$ uzay grubundan altıgen bir biyomalzemedir. HA yapısı PO_4^{3-} , Ca^{2+} ve/veya OH^- 'nin diğer yabancı iyonlarla yer

değiştirilmesine izin verir [48]. Bu nedenle son yıllarda iyon katkılı HA birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. HA yapısının esnek ve stabil özelliği nedeniyle Ca^{2+} iyonları Ag^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} gibi çeşitli metal iyonlarıyla yer değiştirilebilir [49]. İyonların HA yapısına eklenmesi belirli bir uygulama için geliştirilmiş biyouyumluluk, yapısal stabilite, biyoaktivite ve osteokondüktif gibi ek ilaveler sunarken ayrıca kafes parametreleri, morfoloji, kristallik gibi özellikleri uyarlamamıza imkân vermektedir [50].

Antimikrobiyal biyoaktif ince filmlerin kullanılması, başlangıçtaki mikrobiyal yapışma ile kolonizasyonu önlemek ve biyomalzemeler ile tıbbi cihazlarda mikrobiyal esneklik kazandırmak için tercih edilen işlemlerden biri haline gelmiştir [51]. İnsan derisi üzerinde ve içinde doğal olarak yaşayan mikroorganizmalar, alınan önlemlere rağmen, cerrahi müdahale sırasında bir implant malzemesini veya yerleştirme alanını kolayca etkileyebilir [52]. İnsan vücuduna implantasyondan sonra görülen yaygın postoperatif enfeksiyonlar implante edilen biyomalzemedeki bulunan mikroorganizmalardan kaynaklanır ve problemler genellikle biyomalzemelerin çıkarılmasını gerektirir [53]. Saf HA kullanımında uzun süreli stabiliteyi azaltan ve implant hatalarına neden olan antibakteriyel aktivitenin bulunmaması gibi bazı sınırlamalar vardır. Ag^+ iyonları mikrobiyal hücre duvarından geçerek DNA'ya bağlanabilir ve bu şekilde replikasyon işlemine müdahale eder. Bu nedenlerden dolayı, mikropların yapışmasını en aza indirmek için gümüş içerikli HA kaplamalarının geliştirilmesi üzerine çalışmalara odaklanılmaktadır [54].

Çinko (Zn), insan iskelet sisteminin gelişiminde ve normal büyümesinde önemli bir iz elementtir ve proteinlerin HA tarafından adsorpsiyon kabiliyetini artırır ve ayrıca eksikliği, kemik yoğunluğunda da azalmaya neden olmaktadır. Zn osteoblast aktivitesini ve osteoklast farklılaşmasını destekler ve böylece yeni kemik oluşumuna katkı sağlamaktadır [41, 55]. Organizmalarda demirden sonra tipik olarak en bol bulunan ikinci geçiş metali olan Zn, RNA ve DNA replikasyonu ile protein sentezinde görev alan enzimler dâhil, çeşitli enzimler için kofaktör olarak işlev görmektedir [56].

Doğal olarak insan vücudunda bulunan kobalt ise, insan beslenmesi için gereklidir ve B12 vitamininde bulunur. Bir birey günde yaklaşık 300 µg kobaltı yiyecek ve sıvılardan almaktadır. Ortalama 70 kg'lık bir kişi, yaklaşık 1,5 mg kobalt yüküne sahiptir ve kobaltın çoğunluğu karaciğerde bulunmaktadır. Aşırı kobalt esas olarak böbrekler yoluyla atılmaktadır [57].

Yukarıda belirtilen katkılı malzemeler için bazı uygulama örnekleri verirsek; Anjaneyulu ve ark. [58] implant uygulamalarında kullanılmak üzere gümüş katkılı HA kullanılarak *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Escherichia coli* (*E. Coli*) gibi gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite geliştiğini bildirmişlerdir. Webster ve ark. [59], kemik oluşturucu hücrelerin yani osteoblastların yapışmasının ve farklılaşmasının, çinko katkılı HA'da katılanmış HA'ya kıyasla önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir. Ignjatović ve ark. [60] histolojik araştırmalarında, Co-HA kullanılarak osteoporozun neden olduğu bozuklukların onarıldığı ve saf HA'ya kıyasla kemik dokusu yenilenmesini geliştirdiği ve böylece alveoler kemiğin geri kazanılmasını sağladığını rapor etmişlerdir.

2.2. Biyomimetik Yöntem ve Yapay Vücut Sıvısı

HA biyomalzemeleri doğal kaynaklardan veya sentetik olarak hazırlanabilirler [61]. Sentetik nano HA (nHA) üretmek için kullanılan teknikler arasında hidrotermal, sonokimyasal, yaş kimyasal, hidroliz, sol-jel, emülsiyon, mekanik-kimyasal, sulu koloidal çökeltme ve mikrodalga, yanma ve piroliz süreçleri gibi birçok işlem bulunmaktadır [17]. Bununla birlikte biyolojik apatitten sapan ortam özelliklerinin olduğu yüksek sıcaklık, bazik ortam pH'ı, mikrodalga ışınlaması ve ultrasonikasyon koşullarında nHA üretilmesi de mümkündür [62–64]. Bu süreçler, insan kan plazmasında olan ve doğal kemik gelişiminden sorumlu biyolojik çevre içerisinde bulunan iyonları (HCO_3^- , K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , Na^+ , Ca^{2+}) içermeyen stokiometrik nHA oluşturulmasına yol açmıştır [65].

Son zamanlarda biyoseramiklerin mikrodalga destekli çalışması, rutin ısıtma işlemlerinden daha çok ilgi çekmektedir. Rutin ısıtmada başlangıçta dışarıdan ısı

kaynağı ve sonrasında içe doğru radyatif transferinin aksine mikrodalga malzemelerin moleküllerinin içte yarattığı ısıyla olur [61]. Mikrodalga yüksek saflık, küçük parçacık büyüklükleri ve dar boyut dağılımı gibi avantajlara sahiptir [66].

Farklı sentez yöntemleri ile kıyaslanınca sol-jel işlemi de nano yapıları malzemelerin üretiminde oldukça yaygın olduğu literatürden bilinmektedir. Mikrodalga destekli HA sentezi olan önceki çalışmada belirtildiği gibi [1], sol-jel yöntemiyle sentezde sadece başlangıç maddeleri gereklidir ve harici mikrodalga desteği olmadan nano yapılar sentezlenebilir. Sol-jel işlemi, sentezlenen tozların moleküler seviyede kimyasal homojenliğini önemli ölçüde artırabilen öncüllerin karıştırılmasına izin vermektedir. Ayrıca bu yöntemin düşük sentez sıcaklığı, yüksek ürün saflığı, homojen moleküler karışım ve nanopartiküller ve ince filmler oluşturma yeteneğini gibi avantajları da vardır [67]. Sol-jel işlemi ile üretilen HA'nın kristal kafesteki zayıf kristalimsi ve karbonat iyonlarının varlığı nedeniyle, diğerlerinden farklı olarak daha yüksek biyoaktivite göstermesi de sağlanabilir. Bununla birlikte HA'nın sol-jel üretimi ile ilgili çalışmalar her zaman HA sentezine ikinci faz olarak bir kalsiyum oksit (CaO) fazının eşlik ettiğini göstermektedir. Literatürde bildirildiği gibi, CaO HA'nın biyoyumluluğunu azaltmaktadır ve bundan dolayı bu sorunu gidermeye çalışan araştırmalar dikkat çekmektedir [17, 68]. Bu nedenle, mevcut CaO'in kalsine edilmiş tozun seyreltik asit çözeltileri kullanılarak yıkanması veya yaşlanma süresinin arttırılması gibi yollarla giderilmesi denenmiştir [68, 69]. Ayrıca in-vitro çalışmalar sol-jel ile üretilen HA'nın biyolojik olarak bozunabilirliğinin doğal apatite yakın olan geleneksel kemik tozundan daha yüksek olduğu gösterilmiştir [70].

Biyomimetik teknik ise yüksek sıcaklık koşulu, kaplamada düşük mekanik dayanım, kristallik kaybı ve homojen olmayan mikro yapı gibi kısıtlamaları önlemek ve bu sorunu çözmek için alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir [71]. Biyomimetik teknik, insan kan plazmasını inorganik çözünen bileşimi açısından taklit eden SBF olarak adlandırılan sentetik sıvıda gerçekleştirilir. Avantajları şu şekilde özetlenebilir: düşük kristalleşme sıcaklığı, düşük maliyeti, atomik seviye karıştırma sayesinde artan homojenlik ve az ekipman gereksinimi.

Son zamanlarda, biyomimetik mineralizasyon süreci geleneksel yöntemlerle üretilemeyen yeni materyallerin üretilmesine yol açtığı için de dikkat çekmiştir [21, 72, 73]. Biyomimetik HA biyouyumludur ve doğal kemiğin HA yapısına benzerdir [73]. Kokubo ve ark. tarafından biyomimetik metot SBF ile karbonatlı küçük kristallerin ve kusurlu yapıya sahip kemik benzeri apatitin hazırlanmasında kullanılmıştır [74].

SBF'nin çeşitli CaP fazlarına ilişkin termodinamik stabilitesi, aşağıdaki (2.1), (2.2) ve (2.3) Eşitliklerin kullanılmasıyla hesaplanabilir [75]:



$$S = \left(\frac{[A^+]^x [B^-]^y}{K_{sp}} \right)^{\frac{1}{x+y}} \quad (2.2)$$

$$\Delta G = - \left(\frac{RT}{n} \right) \ln(S) \quad (2.3)$$

Burada S süpersatürasyon oranı, K_{sp} ($\text{mol}^9 \text{dm}^{-9}$) çözünürlük çarpımı olup belirli bir sıcaklık için sabittir, ΔG Gibbs serbest enerjisi, T mutlak sıcaklıktır, R evrensel gaz sabiti ve n formüldeki iyon sayısıdır. 37°C 'deki SBF'nin süpersatürasyon derecesindeki enerji değişimi (ΔG), HA ve brushit için sırasıyla $-7,94$ ve $0,26$ 'dır [75]. Oktakalsiyum fosfat (OCP), dikalsiyum fosfat (DCPA), TCP gibi diğer CaP fazlarına kıyasla, $1x\text{SBF}$ içerisinde 37°C 'de ΔG 'nin minimum olan $-7,94$ kJ/mol değeri HA çökeltisine aittir. Bu nedenle HA, $1x\text{SBF}$ 'de çekirdeklenecek olan en olası fazdır. Ayrıca CaP çökeltisinin bileşimi ile yapısı çözeltideki pH değeri, sıcaklık ve iyon konsantrasyonundan etkilenebilir. Örneğin, yüksek pH HA'nın çökmesini desteklerken düşük pH ve sıcaklık brushit çökmesini desteklemektedir. HA doğal kemik dokusundaki mineral faz olarak bilinir ancak PO_4^{3-} ve Ca^{2+} 'un in-vivo çekirdeklenmesi doğrudan HA'nın oluşmasına yol açmaz. HA fazından önce oluşturulan ve daha sonra in-vivo olarak HA'ya dönüştürülen brushit fazının öncül faz olduğu bilinmektedir [76]. Fizyolojik çözeltilerde çok kararlı olduğu için çoğu biyomedikal uygulamada kaplama olarak kullanılmaktadır. Daha çözünür bir CaP'ın

kullanımı implantasyondan sonraki ilk periyotta sabitlenme için daha iyi olacağı bulunmuştur.

2.3. Ti ve Ti6Al4V Yüzey işlemleri ve Biyometik Kaplama

Ti ve alaşımları (örn. Ti6Al4V) biyouyumluluk, korozyona karşı büyük direnç ve üstün mekanik özelliklerinden dolayı yük taşıyan ortopedik ve dental uygulamalarda yaygın şekilde kullanılan biyomalzemelerdendir [77–81]. Ti ve alaşımları dökme, yüksek korozyon direnci ve özellikle düşük kütle yoğunluğundan dolayı rekonstrüktif tıpta kullanılan önemli malzemelerdir. Tıbbi uygulamalarda kullanılması ve paslanmaz çelik gibi malzemelerden farklı olarak insan kemiğine yakın mekanik özellikler göstermelerine rağmen biyolojik ortamlarda yüksek inaktiviteye sahiptirler. Bundan dolayı Ti ve alaşımı implantlarının yüzey kaplama uygulamaları daha biyouyumlu malzemeler elde edilmesi için önem arz etmektedir [11].

Ti ve alaşımları (örn. Ti6Al4V) üzerindeki CaP bazlı biyoseramik kaplamalar, biyouyumlulukları ve insan kemiği ile bağ yapma özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir [82]. Biyo inert Ti esaslı malzemeler canlı vücuda implantasyondan sonra genellikle kemiği çevreleyerek izole eden fibröz doku tabakası ile kaplanır. Biyoaktif olan sınırlı seramik çeşidi fibröz doku oluşmadan implante edilen yerdeki kemiğe bağlanır. Vücut içine implantasyondan sonra biyoaktif olan implantlar kemiğe yapışmayı güçlendirebilir [83, 84]. HA [85] ve brushit [86] gibi biyoaktif CaP kemik ve Ti6Al4V implant arasındaki yüzey afinitesini yüzey ve kemik arasında fibröz dokuya müdahale etmeden iyileştirebilir [87].

Ti ve alaşımları (örn. Ti6Al4V) vücuda implante edildiğinde kemiğe bağlanma yeteneğini zayıflatabilir ve biyo inert yüzeyi ile yetersiz osseointegrasyondan dolayı implant yüzeyi ve kemik arasında birleşme başarısızlığına neden olabilir. Ti ve alaşımlarının yüzey osteokondüktifliği, implant sabitlenmesi, kemik büyümesini desteklemesi ve konak kemik dokusu ile implant arasında doğrudan bir kimyasal bağ oluşturması için biyolojik olarak modifiye edilmelidir. Ti ve alaşımlarının yüzeyinin biyomodifikasyonu için HA biyoseramiği iyi bir seçimdir [54, 88, 89]. Biyolojik

uyumluluk, hücre çoğalması, yüzeyde doğrudan kemik oluşumu ve kemik oluşturan hücrelerin farklılaşması Ti yüzeyindeki HA kaplamaları kullanılarak geliştirilebilir [90].

Metal yüzeyinin HA kaplaması doğal kemik ve diğer dokular ile implantlar arasındaki osseointegrasyonun artırılması için önemlidir. Metalik kaplamaların amaçlarından birkaçı şu şekildedir: metalin yük taşıma kabiliyeti gibi mekanik özelliklerini korumak; kemik bileşimine yakınlığı sayesinde eş zamanlı olarak implantın biyouyumluluğunu arttırmak [11, 91].

Fizikokimyasal kaplama tekniklerinden biri olan biyomimetik yöntem tekniği metal altlığın SFB içerisine daldırılmasıyla gerçekleştirilir. Bu stratejisinin genelde kullanılan plazma püskürtme yöntemine kıyasla basitliği ve düşük yatırım maliyeti gibi üstünlükleri vardır. Ayrıca yüzeyleri karmaşık geometrilere sahip olan veya gözenekli yapıdaki substratları kaplamak için kullanılabilir ve canlı dokuların yenilenmesini hızlandırmak için oluşturduğu biyokatmana organik molekülleri dâhil etmeyi mümkün kılar [80, 92–94].

HA için, biyomimetik yöntem ile metalik implant malzemelerin kaplanması tekniği birkaç aşamadan oluşmaktadır. Birincisi, aktif fonksiyonel gruplarla değişim yaparak metal yüzey üzerinde negatif yüklü çekirdeklenme yerlerinin yaratılmasıdır. İkincisi, insan kan plazmasının kimyasal bileşimine eşdeğer SBF ortamında biyomineralizasyon işlemidir. Negatif yüklü metal yüzey ile pozitif yüklü Ca^{2+} iyonlarının arasındaki elektrostatik etkileşimler ile tazelenen SBF sayesinde artan Ca^{2+} iyonları yüzeyin yeniden pozitif yüklenmesini sağlar. Bu olay katman katman HA'nın kendi kendine oluşumunu destekleyen PO_4^{3-} anyonlarının adsorpsiyonuna neden olur [11].

Biyomimetik kaplamalar CaP çekirdeklerinin heterojen depozisyonu ile başlatılır. Buna rağmen, düzenli kaplanmış CaP tabakasının oluşumu, 1xSBF çözeltisinin düzenli olarak yenilenmesi ile en az 7 gün sürmektedir. SBF'nin fizyolojik koşullarda ($37^\circ C$, pH 7,2) metastabil olmasından dolayı bu işlem zaman alıcıdır. Tez

kapsamındaki modifiye edilmiş SBF çalışmasında, biyomimetik CaP kaplama tabakaları alkali-ısıtılmış işlem görmüş ve sodyum titanat fazının yüzeylerinde oluşturulduğu Ti6Al4V substratlarının Ca ve P tuzlarınca (m-xSBF) ve içerdiği her bir tuzun 5 kat konsantre edilmesiyle oluşturulan SBF çözeltilerine (5xSBF) 37°C ve pH 6'da daldırılmasıyla elde edilmiştir. pH dolaylı olarak iyonik kuvvet tarafından kontrol edildiği için supersaturated SBF çözeltileri için 7,4'ten daha düşük pH değeri iyonik çözünürlüğü arttırmak için gereklidir [95]. Bu metot, metastabil solüsyon ortamının yenilenmesini gereksiz kılar ve ayrıca, normal süpersatüre tamponlanmış (pH=7,4) SBF çözeltisine kıyasla Ti6Al4V substrat yüzeylerindeki CaP kaplama oluşumunu önemli ölçüde hızlandırır. Tez kapsamında yapılmış olan çalışma SBF'de (m-5xSBF) sadece Ca ve P tuzlarının 5 kat daha yoğun olduğu yeni bir biyomimetik ortamdaki Ti6Al4V substratında CaP çekirdeklenme mekanizmasını araştırmıştır. Elde edilen çözelti ile biyomimetik ortamda iki gün içinde ilk kez Ti6Al4V şeritleri üzerinde tek fazlı brushit fazı elde edilmiştir. Biyomineralizasyon süreçlerinde oluşan fazların karmaşıklığı nedeniyle, CaP biyoseramik fazlarını kontrol eden parametreleri oluşturmak için literatürde kapsamlı araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir ek iyon içeren veya içermeyen SBF ortamındaki yüzey modifikasyonu için metalik substratlar üzerinde brushit kaplamasını içeren az sayıda çalışma mevcuttur [96–98]. Yaptığımız çalışmadan farklı olarak önceki çalışmalarda bifazik form olarak elde edildiği görülmektedir. Bildiğimiz kadarıyla, Ti6Al4V üzerinde sadece tek fazlı brushit tabakasının kaplanması için biyomimetik bir ortam olarak modifiye edilmiş 5xSBF kullanılan herhangi bir çalışma bildirilmemiştir.

Ayrıca kaplama oluşumunu ve yüzey özelliklerini etkilediğinden dolayı; heterojen HA nanokristal çekirdeklenmesi için metalik yüzeyin kimyasal modifikasyonu önemlidir [11]. Ti ve Ti6Al4V implantlarının hidrofilitiklik, bileşim ve pürüzlülük gibi yüzey özellikleri osseointegrasyon kalitesi ve oranı üzerinde önemli bir rol oynar [80, 99].

Biyomimetik CaP kaplamaları, kan plazmasındaki inorganik tuzları taklit eden SBF çözeltilerinin kullanılmasıyla metalik biyomedikal substratlar üzerinde elde edilmiştir. Bu yöntem yüzey mineral çekirdeklenmesi ve büyümesi, kemiklerde ve dişlerde mineral oluşumu da dâhil olmak üzere birkaç doğal yola benzeyen bir biyomimetik

yöntemdir. Etkin biyomimetik çekirdeklenmeyi sağlamak için şu iki gereksinim karşılanmalıdır: (1) Ti6Al4V yüzeyinin etching-ısıtma işlemleriyle aktivasyonu; (2) çözelti içinde yüksek konsantrasyonlarda Ca^{2+} ve PO_4^{3-} bileşenleri. Bu adımlar yüzey pürüzlülüğünü arttırmak [100, 101] ve Ti6Al4V yüzeyinde elde edilen CaP kaplamalarının biyomimetik kaplama ile mekanik stabilitesini arttırmak ve ayrıca CaP'ın heterojen birikimini arttırmak için kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklık ve basınç gibi şiddetli reaksiyon koşullarının olmadığı biyomimetik çekirdeklenme yöntemi kullanıldığında, 37°C 'de elde edilen CaP biyoseramikleri, doğal kemiğe benzeyen yapı ve biyouyumluluk göstermektedir.

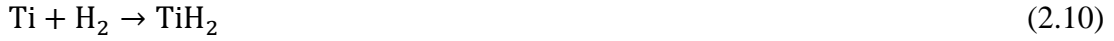
Yukarıda tarif edilen sonuçlar göz önüne alındığında, NaOH ve HCl ön yüzey işlemleri sırasında Ti yüzeyinin olası kimyasal değişimleri ve SBF'de apatit oluşumu Şekil 2.1.'de verilmiştir. HCl asidik ve NaOH alkali işlemleri Ti yüzeyini biyoaktif hale getirir ve metalik implantın osseointegrasyonunu iyileştiren materyal çözünmesi nedeniyle yüzeyin pürüzlenmesini sağlar. NaOH alkali ve HCl asidik işlemlerinde, Ti yüzeyinde meydana gelen reaksiyonlar aşağıdaki gibidir [80, 91]:

NaOH ile;

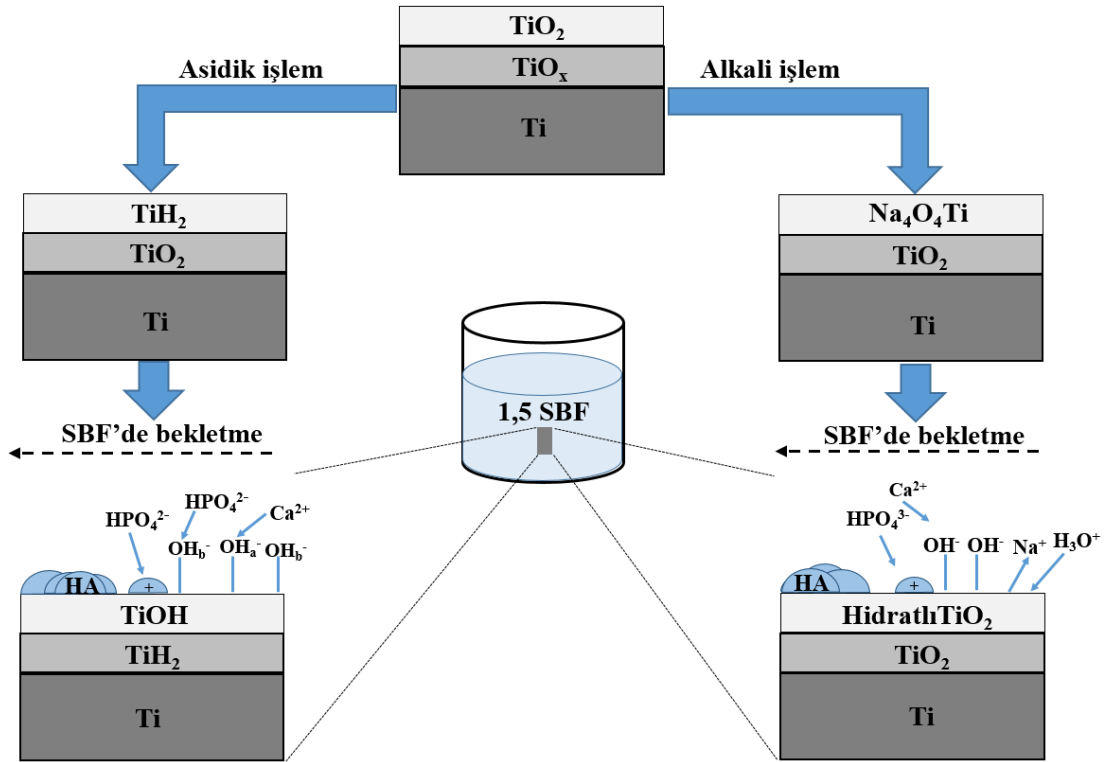


HCl ile;





Biyolojik olarak aktif moleküllerin substrat yüzeyleri üzerinde hareketsiz hale getirilmesi için çeşitli prosedürler literatürde geniş bir şekilde incelenmiştir [102, 103]. Bu tür fonksiyonellendirilmiş implant yüzeyleri, daha ileri modifikasyonlar için bağ yapma kabiliyeti olan fonksiyonel gruplar sağlar ve farklı organik moleküller içeren kendinden bir araya gelen bağlantı katmanlarının kovalent immobilizasyonu ile de ek olarak fonksiyonellendirilebilir.



Şekil 2.1. NaOH ve HCl ön yüzey işlemleri sırasında Ti yüzeyinde kimyasal değişiklikler ve SBF'deki HA çekirdeklenmesi.

Stabilize edilmiş bileşiklerin sabitlenmesini sağlayan kovalent bağ, adsorpsiyon işlemlerine dayanan kaplamalara alternatif bir yaklaşımdır. Silan bağlantı tabakasının oluşma mekanizması silan grubunun aktive edilmiş yüzeydeki hidroksil grubundan proton transferi ile yer değiştirilmesini içerir. Bu olay alkolün ortamdaki uzaklaştırılmasına neden olur. 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) uygulanmış

yüzeyler kendinden toplanma, kovalent bağ, yüzey başlangıçlı polimerizasyon ve çok katmanlı oluşum gibi çeşitli yüzey yapılarını sağlayabilir.

Çeşitli substrat yüzeylerinde silan oluşumunu inceleyen önceki çalışmalar, hücre yapışmasını, hücre çoğalmasını ve osteoblast yapışmasını iyileştiren HA çekirdeklenmesini destekleyebileceğini göstermiştir.

2.4. Biyomimetik Yapı İskeleleri ve Biyomalzemelerde Kullanılan Bileşenler

Doku mühendisliği alanındaki ana hedef yeni tasarlanmış biyomalzemelerin üretimini destekleyecek çok çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip biyomimetik iskeleleri iyileştirmektir [104]. Kemik doku mühendisliğinde yapı iskelesinin kullanılabilmesi için birkaç gereklilik şu şekildedir: Hücre farklılaşmasını oluşturmak ve ECM'yi desteklemek için uygun yüzey kimyasına sahip olmalı [105]; kemik dokusunun yapı iskelesinin yerini alması için istenmeyen yan ürünlere neden olmadan uygun oranlarda biyobozunur olmalı; çeşitli boyut ve şekillerde kolayca üretilebilir olmalı; implantasyon için öngörülen yere uygun mekanik özelliklere sahip olmalı [106] ve oksijen ile metabolik artık ürünlerin değişiminin ayrıca in-vivo vaskülarizasyonun meydana gelmesi için besinlerin yapı iskelesinin içerisine yayılmasına destek vermelidir [82, 107–109].

Kemik doku mühendisliğinde yapı iskelesi olarak kullanılan malzemeler üç gruba ayrılır: inorganik [110, 111], polimer [112, 113] ve biyolojik [114, 115]. Sadece tek bir tip kullanılarak mükemmel kemik iskelesinin gerekliliklerini karşılamak oldukça zordur. Biyolojik yapı iskelesi türevlerindeki elektrik performansı ve mekanik özellikler iyi değildir ve inorganik yapı iskele materyalleri de kırılgandır. Polimer malzemelerin ise mekanik performansı ve hücre uyumluluğu kötüdür [14]. Gün geçtikçe daha çok dikkat çeken en az iki tip bileşen içeren sentetik ve doğal olarak türetilen malzemelerin kombinasyonlarından oluşan kompozit iskeleler [116, 117] bileşenlerin eksikliklerinden kurtularak ve her bir bileşenin özelliklerini göstererek gelişmiş özelliklere sahip olmaktadır. Bu nedenle, kemik onarımı için alternatif olarak çok bileşenli iskelenin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir.

HA gözenekli kemik iskelesi ve dolgu maddesi olarak kullanımı ile kemik büyümesini, mekanik özellikleri ve osseointegrasyonu iyileştirdiği bilinmektedir [118]. Bununla birlikte HA yapı iskelesinin, düşük çözünme oranı ve kırılabilirliği nedeniyle kemik doku mühendisliğinde ek bileşenlerle desteklenmesi avantajlarını arttırmaktadır [119, 120].

Col vücut tarafından emilebilen, iyi biyouyumluluk ve düşük antijenisite gösteren, hücre çoğalmasına ve bağlanmasına iyi cevap veren, nöronların nörit gelişimi için olumlu mikro-çevre koşullarının sağlayan ve osteoblastlar ile fibroblastların adezyonu gerçekleştiren biyolojik olarak bozunabilen doğal bir biyopolimerdir [114, 121]. ECM temel olarak hem hidrojel durumunda olan Col'den oluşur hem de glikosaminoglikanların ve proteinlerin çeşitli biyolojik fonksiyonlarına katılır [122]. Col'ün iskele olarak kullanılmasında yukarıda belirtilen özellikler önemli tercih sebepleridir. Bununla birlikte hızlı biyobozunma oranı, yüksek şişme kapasitesi ve düşük mekanik mukavemeti çok çeşitli kemik dokusu uygulamasında tek başına kullanımını engellemektedir [123–125].

CS uygun biyobozunurluğu, biyouyumluluğu, gözenekli yapısı, hücre tutunması ve yaşamı için uygunluğu, in-vitro ve in-vivo kemik yenilenmesini artırma yeteneği, antibakteriyel doğası, yara iyileştirici aktivitesi, kondral ve osseöz hastalıkların onarımında potansiyel olarak etkili olması ve polisakkarit olan omurgasının yapısal olarak glikozaminoglikanlara benzemesi gibi biyolojik özelliklerinden dolayı mükemmel bir toksik olmayan doğal biyopolimerdir [126]. Bu özellikler, kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere CS'yi ümit vadeden yapı iskelesi yapmaktadır. Mekanik kuvveti iletmek ve matris mineralizasyonu oluşturmak için CS yapı iskelesinin kemik doku mühendisliğinde kullanılması için biyolojik özelliğinin ve mekanik mukavemetinin geliştirilmeye ihtiyacı vardır [127–129].

Karbon nanotüp (CNT) takviye malzemesinin yüksek kimyasal stabiliteye [130], mükemmel mekanik [131] ve elektronik özelliklere [132], güçlü protein Emilimi [133] ve hücre yapışmasına [134], hücre farklılaşması [135] ve in-vivo biyouyumluluğa [136, 137] sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca tıbbi substrat üzerindeki kırılabilir HA

biyoseramik kaplamalarını biyolojik etkilerini azaltmadan güçlendirmekte ve böylece yüksek yapışma ve sertlik sağlama [138] rollerinden dolayı dikkat çekici bir malzeme olmaktadır [139]. Kompozit kaplamalarda CNT'ler yüksek spesifik yüzey alanları, benzersiz tek boyutlu yapıları, fiziksel ve mekanik özellikleri gibi özgünlükleri nedeniyle kemik doku mühendisliğin alanında destek kompozit malzemesi olarak büyük ilgi görmüştür [140].

Ayrıca, yüzeylerinin kimyasal modifikasyonunun kolay olmasından dolayı CNT'lerin biyomedikal uygulamalar için modifiye edilebilmesinden dolayı yüzeyinin farklı moleküller ile zenginleştirilerek kullanılma imkânları vardır. Bahsedilen üstün özelliklerin birleşimi CNT'leri nano-hibrit yapı iskelesinin gelişiminde biyoyumluluğa sahip takviye dolgu maddeleri olarak cazip hale getirmektedir [141–143]. Ayrıca, doğal kemikte bulunan Col liflerini taklit etmesi açısından CNT'ler kullanan HA içerikli kaplama, kemik implantı uygulamaları için umut vaat eden bir kompozittir.

Biyomalzemelerde kullanılan bir diğer bileşen de grafen oksittir (GO). Başlangıç maddesi olarak kullanılan grafen kimyasal ve fiziksel özellikler (yüksek yüzey alanı ($2620\text{m}^2/\text{g}$), düşük kütle, yüksek elektriksel ve termal iletkenlik), yüksek mekanik mukavemet ve kanıtlanmış biyoyumluluktan dolayı biyomimetik mineralizasyon için ideal ve ümit vaat eden nano ölçekli bir takviye malzemesidir [144–151]. GO osteoblastların çoğalmasını ve adezyonunu destekleyen hidrofilik fonksiyonel gruplar (epoksi, hidroksil ve karboksil grubu) içeren oksijenle bezenmiş grafen tabakalar olarak düşünülebilir [152]. Grafenin kendine ait avantajlarına artı olarak fonksiyonellendirilme kabiliyetlerinden dolayı GO son zamanlarda oldukça dikkat çeken malzemeler arasında yer almaktadır.

GO ile ilgili önceki çalışmalarda [153], hidrofilik fonksiyonel grupların bulunan oksijenin Ca^{2+} iyonlarını çöktürmek için etkili çekirdeklenme bölgeleri olarak rol oynayabildiği ve bu nedenle HA/TCP'nin hem kristalizasyon hem de büyüme sürecini etkilediği gösterilmiştir [154]. Öte yandan, HA/TCP parçacıklarının oksijen içeren hidrofilik fonksiyonel grupların olmadığı indirgenmiş grafen oksit (RGO) yüzeyinde

çekirdeklendiği de gösterilmiştir [155]. Böylece bu durum; HA/TCP çekirdeklenmesi için GO'nun hidrofilik fonksiyonel gruplarının içerdiği oksijen tipinin ve yoğunluğunun etkilerinin açıklığa kavuşturulması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır.

GO ve HA/TCP'yi birleştirmek, doku mühendisliği için cazip ve aynı zamanda doğal kemik dokularını taklit edebilecek malzemeler oluşturmak için iyi bir seçenektir. Geleneksel karıştırma ile HA/TCP-GO kompozitlerinin tamamen homojen bir bileşimini yapmak zordur. Buna karşılık, inorganik-organik hibrit materyallerin sentezi yoluyla biyolojik kökenli materyallere benzerlik gösteren biyomimetik biyomineralizasyon çok büyük ilgi çekmektedir. Kemik oluşumunu başlatabilen biyomimetik yöntem, insan refahı için geliştirilen fonksiyonel materyallerin tasarımı üzerinde büyük bir yeniliği desteklemiştir [156–160].

2.5. Akıllı İlaç Dağıtım Sistemi ve Bileşenleri

Kanser, dünya çapında insan ölümünün en yaygın nedenlerinden biridir ve 2030 yılına kadar 13,2 milyon ölüme neden olabileceği öngörülmektedir [161, 162]. En yaygın şekilde kullanılan klinik tedaviler arasında kemoterapötik ajanların sistemik intravenöz uygulaması yer alır. Yan etkilerinin ve hem kısa hem de uzun vadeli toksik risklerinin olmasından dolayı geleneksel kemoterapi ajanları tümör hücreleri ile birlikte normal hücreler üzerinde de dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle kemoterapi, ilaçların düşük terapötik etkinliği ve sağlıklı dokular üzerindeki yan etkileri nedeniyle sıklıkla tatmin edici olmayan bir iyileşme etkisine neden olmaktadır [163].

Geniş spektrumlu bir antikanser ilacı olan Dox en yaygın kullanılan antikanser kemoterapötiklerinden biridir ve çeşitli kanser türlerinde mükemmel terapötik etkinlik göstermektedir [164, 165]. Bununla birlikte, serbest Dox'un intravenöz kemoterapisi sıklıkla sistemik toksisiteye ve klinik uygulamalarını inhibe eden kardiyo toksisitesi ise tiflit, mielosupresyon, bulantı, kusma ve alopesi gibi ciddi komplikasyonlara neden olmaktadır [166]. Bu nedenlerden dolayı Dox için toksik yan etkileri en aza indirmeyi ve antikanser etkinliğini arttırmayı amaçlayan çeşitli etkili dağıtım sistemleri geliştirmek gerçekten bir aciliyet meselesi haline almıştır.

Son yıllarda, uyaranlara duyarlı çok fonksiyonlu akıllı antikanser ilaç dağıtım sistemlerinin (MSDDS) geliştirilmesi biyotıpta büyük ilgi görmüştür ve bu kapsam büyük ölçüde genişleyecektir [167, 168]. Geleneksel dozaj formlarına kıyasla birçok avantajı olan terapötik nanoyapılandırılmış MSDDS, çoklu görüntüleme ve farklı kanser türlerinin tedavisi gibi çok sayıda biyomedikal uygulamada önemli bir rol oynamaktadır [169]. Hedeflenen ilaç iletimi için dış etkilere duyarlı kontrollü salınım yapabilen akıllı sistemlerin uyarılması kanser tedavisinde çok önemlidir. Özellikle, pH'a duyarlı akıllı ilaç verme sistemi, normal hücre mikro ortamlarına (yani 7,4) kıyasla kanserli hücrelerin daha asidik (pH 4,0-7,0) mikro ortamları nedeniyle büyük ilgi çekmektedir [170, 171]. Akıllı ilaç dağıtım sistemi, ilaç taşıyıcılarından aşırı salınan ilacın neden olduğu yan etkiyi önlemeli veya azaltmalıdır çünkü aşırı salınan ilaç kısa sürede emilebilir ve hem metabolik organlarda hem de bitişik dokularda birikebilir [172]. İdeal bir MSDDS, yukarıdakilere ek olarak şu özelliklere de sahip olmalıdır: biyouyumluluk, ayarlanabilir özellik, bileşiklerin kolay sentezi, enjekte edilebilirlik ve yerinde jelleşen hidrojel gibi uygun sistem tipi [173]. Ancak, bu özellikleri birleştiren bir sisteme duyulan ihtiyaç bugüne kadar bu alanda büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir. Bu noktada, mevcut araştırma alanı, bu zorluğun üstesinden gelmek için bahsi geçen özellikleri bir araya getiren yeni nesil ilaç dağıtım sistemleri talep etmektedir.

NCQDs moleküller ile kolayca konjüge olmak için aktif ek bağlanma grupları gibi karbon çekirdeğinin dışında -CQDs'un yüzeyinde- ek fonksiyonel gruplar bulunduklarından CQDs'a kıyasla daha iyi performans göstermektedir. Bu nedenle NCQDs son yıllarda dünya çapında birçok araştırma grubu tarafından yeni nesil çok işlevli nanotıp araştırma alanı olarak artan ilgi çekmeye devam etmektedir [174]. NCQDs hala emekleme aşamasındadır ve bilim insanlarına yenilikçi tasarım, daha fazla fonksiyon, benzeri görülmemiş olasılıklar ve kullanım genişletmek amacıyla daha fazla çaba göstermeleri için ilham vermektedir [175].

HA son zamanlarda biyosistemlere toksik olmama, etkileşimleri konjüge ederek ilaç taşıma kabiliyeti, -OH içermesi, hücre zarlarına nüfuz etme kapasitesine sahip çok sayıda farklı bağlanma yerlerine (yani negatif yüklü P bölgeleri ve yüzeyinde pozitif

yüklü Ca bölgeleri) sahip olması nedeni ile ilaç taşıma sistemlerinin tasarımında büyük ilgi görmüştür [176, 177]. Ayrıca HA, pH'a duyarlıdır ve orta derecede asidik koşullar altında (osteoklastlar tarafından veya bir hücre içindeki lizozomda emilim sırasında olduğu gibi) fosfor (P) ve kalsiyum (Ca) HA yüzeyinden ayrışabilir. Bu iyonlar herhangi bir yan etki olmaksızın hücre tarafından atılabilir veya metabolize edilebilir [178]. Tez çalışması kapsamında, ilaç sızıntısı olmayan uzun süreli ilaç salınımına sahip pH'a duyarlı akıllı ilaç dağıtım sistemi elde etmek için HA'nın etkili bir yerinde jelleşme hidrojel tipi ilaç dağıtım sistemlerinde uygun etkileşimleri içeren bileşen olarak kullanılabileceğini önermekteyiz.

Bildiğimiz kadarıyla, çok fonksiyonlu özelliklere sahip bu akıllı ilaç dağıtım sistemi (yerinde jelleşen NCQDs/Dox/HA) tez kapsamında ilk kez sunulmaktadır. Ayrıca, NCQDs ve Dox molekülleri arasındaki dinamik Schiff bazlı kimyasal bağlanma, bugüne kadar benzer bir HA içerikli hibritin rastlanmadığı yerinde oluşan ve pH duyarlı NCQDs bazlı akıllı hidrojel için önemli bir özelliktir.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

SBF çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal reaktifler; sodyum klorür (NaCl, Merck, CAS: 7647-14-5), sodyum hidrojen karbonat (NaHCO₃, Sigma Aldrich, CAS: 144-55-8), potasyum klorür (KCl, Sigma Aldrich, CAS: 7447-40-7), potasyum hidrojen fosfat trihidrat (K₂HPO₄.3H₂O, Merck, CAS: 16788-57-1), magnezyum klorür heksahidrat (MgCl₂.6H₂O, Merck, CAS: 7791-18-6), kalsiyum klorür (CaCl₂, Merck, CAS: 10043-52-4), sodyum sülfat (Na₂SO₄, Merck, CAS: 7757-82-6), tris(hidroksimetil)-3-aminometan [Tris, (CH₂OH)₃CNH₂, Sigma Aldrich, CAS: 77-86-1], hidroklorik asit (HCl, %37, Sigma Aldrich) kullanılmıştır.

SBF pH'ı Tris ve 1,0 M HCl kullanılarak ayarlanmıştır. SBF içerisinde ek fosfat kaynağı olarak di-amonyum hidrojen fosfat (NH₄)₂HPO₄, kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum klorür (CaCl₂), kalsiyum nitrat tetrahidrat (Ca(NO₃)₂.4H₂O) ve kalsiyum hidroksit (Ca(OH)₂) kullanılmıştır.

Modifiye edilmiş SBF çözeltisi (m-5xSBF) normal SBF'ye göre 5 kat daha konsantre K₂HPO₄.3H₂O ve CaCl₂ tuzları ile hazırlanırken 5xSBF çözeltisi ise tüm reaktiflerin normal SBF'den 5 kat daha konsantre edilmesiyle hazırlanmıştır.

Kalsiyum ve fosfat başlangıç maddeleri olan Ca(OH)₂ ve H₃PO₄, farklı koşullar altında sentezlenmiş olan HA elde etmek için kullanılmıştır.

DI-H₂O ve 25 mL etanol (C₂H₅OH, Sigma Aldrich) çözelti ortamları için kullanılmış ve her iki çözelti için pH, amonyum hidroksit (NH₄OH, Sigma Aldrich) kullanılarak ayarlanmıştır.

Doğal grafit pulları (karbon içeriği:%99,9, 325 ağ, Sigma Aldrich, CAS: 7782-42-5), potasyum persülfat (K₂S₂O₈, Sigma Aldrich, CAS: 7727-21-1), fosfor pentoksit (P₄O₁₀, Sigma Aldrich, CAS: 1314-56-3), potasyum permanganat (KMnO₄, Sigma Aldrich, CAS: 7722-64-7), hidrojen peroksit (H₂O₂,%30, Sigma Aldrich) ve sodyum borhidrür (NaBH₄, Sigma Aldrich, CAS: 16940-66-2) SBF ile 1,5xSBF'nin hazırlanması [179] ve GO'nun sentezi ile indirgenmesi için kullanılmıştır.

Saf Ti plakalar (99,2; Alfa Aesar) ile Ti6Al4V alaşımı (Grade 5) kaplama substratları olarak, # 240, 400 ve 800 silisyum karbür (SiC) kâğıdı zımparalama işlemlerinde, aseton ve etanol temizleme işlemlerinde; 5M NaOH ve 1 N HCl çözeltileri ise ön yüzey işlemlerinde kullanılmıştır.

Tip I Col (Sigma Aldrich, CAS: 9007-34-5), CS tozu (CS, Sigma Aldrich, CAS: 9012-76-4), asetik asit (CH₃CO₂H, Sigma Aldrich, CAS: 64-19-7), sodyum hidroksit (NaOH, Sigma Aldrich, CAS: 1310-73-2), etanol (CH₃CH₂OH, CAS: 64-17-5) yapı iskelelerinin hazırlanması aşamalarında kullanılmıştır.

Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT, Sigma Aldrich, CAS: 308068-56-6, HNO₃ (Sigma Aldrich, CAS: 7697-37-2), H₂SO₄ (Sigma Aldrich, CAS: 7664-93-9), EDC (Sigma Aldrich, CAS: 25952-53-8), NHS (Sigma Aldrich, CAS: 6066-82-6), APTES (Sigma Aldrich, CAS: 919-30-2), AgNO₃ (Sigma Aldrich, CAS: 7761-88-8), Zn(NO₃)₂.6H₂O (Sigma Aldrich, CAS: 10196-18-6), Co(NO₃)₂.6H₂O (Sigma Aldrich, CAS: 10026-22-9), NaOH (Sigma Aldrich, CAS: 1310-73-2), KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, CAS: 7778-77-0), CH₃CH₂OH (Sigma Aldrich, CAS: 64-17-5) başlangıç maddeleri katkılanmamış ve Ag⁺, Zn²⁺ veya Co²⁺ katkılı HA, CNT'nin fonksiyonellendirilmesi, fosfat tamponunun hazırlanması, Ti yüzeylerin fonksiyonellendirilmesi, kompozit eldesi ve fonksiyonellendirilmiş Ti yüzeyine kaplama için kullanılmıştır.

Al çubukları ve epoksi kaplama adezyonu ölçümünde kullanılmıştır. Formamid (polar) ve diiodometan (apolar) çözeltileri yüzey enerjilerinin hesaplanması için ıslatma sıvıları olarak kullanılmıştır. Sükroz tozu (yerel süper market) ve yemeklik yağ (yerel süper market), üre ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, Sigma Aldrich), sodyum hidrojen karbonat (NaHCO_3 , Sigma Aldrich), asetik asit ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, Sigma), sodyum asetat (CH_3COONa , Sigma), potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4 , Sigma) ve potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4 , Sigma) başlangıç maddeleri NCQDs'nin sentezi ile asetat tamponlarının (pH=4,0 ve 5,5) ve fosfat tamponlarının (pH=6,5 ve 7,4) hazırlanması için kullanılmıştır. *S. aureus* ve besiyeri bakteri testleri için kullanılmıştır.

İnsan osteosarcoma hücre çizgisi (MG-63, American Type of Culture Collection), 3-(4, 5-Dimetil-2-tiyazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT, Sigma Aldrich, CAS: 298-93-1), dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma Aldrich, CAS: 67-68-5) ve Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Sigma Aldrich) malzemeleri sitotoksikite testini gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Fare fibroblast hücreleri (L929, American Type of Culture Collection), meme kanseri hücreleri (MCF-7, American Type of Culture Collection), doksorubisin (Dox, KOCAK Farma), fetal sığır serumu (FBS), penisilin (Sigma) ve streptomisin (Sigma) malzemeleri in-vitro hücre değerlendirme çalışmalarında kullanılmıştır.

Burada kullanılan reaktifler analitik derecelidir ve daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır. Tüm sentez reaksiyonlarında, saflaştırma basamaklarında ve çözelti ortamlarında kullanılan DI- H_2O yüksek saflaştırma için Labconco Water Pro sistemi (direnç $\sim 18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$) yoluyla elde edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

Numunelerin karakterizasyon aşamalarında X-ışını kırınımı (XRD, D/Max 2200 LV), Raman (Kaiser RamanRxn), taramalı elektron mikroskopisi (SEM, JEOL, JMS 6060) ve bağlantılı enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (EDS), fourier dönüşümü kızılötesi

(FTIR, Perkin Elmer, Spectrum Two) spektroskopisi, termogravimetrik analiz (TGA, Netzsch), Brauner-Emet-Teller ve Barrett-Joyner-Halenda (BET ve BJH) analizi (Micromeritics ASAP 2010), UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu-2600), optik mikroskop (Nikon, L150), üniversal test makinesi (Instron), alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM, Quanta 450 FEG), tünellemeli elektron mikroskobu (TEM, Hitachi HT-7700), X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS, Specs-Flex XPS), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS, CHI-660C), tansiyometre (Attention), zeta ve partikül boyut ölçer (Nano Plus), mikroplaka okuyucu (Elisa) ve flüoresan mikroskop cihazları kullanılmıştır.

Numunelerin hazırlık aşamalarında mikrodalga fırın (MARS5, CEM Corp.), Labconco Water Pro Bt ultra saf su cihazı, liyofilizatör (Labconco-Freezone 6), pH metre (Mettler Toledo, seven easy), santrifüj (Rotina 420, Hettich), çift kapılı buzdolabı (Liebherr), su banyosu (Nuve, ST 30), sonikatör (QSonica, 500 W), vakumlu fırın (Binder), yüksek dereceli fırın (Nabertherm, GmbH), manyetik karıştırıcı (IKA C-MAG), orbital çalkalayıcı (VWR), terazi (Shimadzu), manuel pres (MSE) ve inkübatör cihazları kullanılmıştır.

3.2.2. Numunelerin sentezi ve hazırlık aşamaları

3.2.2.1. Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak hidroksiapatitin mikrodalga destekli biyomimetik sentezi çalışması

Bu çalışmada 1,5xSBF olarak adlandırılan 1,5 kat konsantre SBF çözeltisi kullanılmıştır [179]. Kan plazması ve SBF iyonik bileşimi Tablo 3.1.'de verilmiştir. Başlangıç maddeleri Tablo 3.1.'de olan konsantrasyonların 1,5 katı konsantrasyona göre ayarlanarak DI-H₂O içinde çözünmüştür.

1,5xSBF hazırlanırken, çökelmeyi önlemek için Tris ve 1,0M HCl kullanılarak pH 7,4'e ayarlanmıştır. Reaktiflerin 700 mL suda her biri tamamen çözüldükten sonra diğeri ilave edilmiştir. Hazırlanan SBF çözeltileri, bozulma olmaksızın bir ay boyunca 4°C'de depolama avantajına sahiptir.

Tablo 3.1. 1,5xSBF ve kan plazmasındaki iyon konsantrasyonları [179].

İyon (mM)	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
Kan	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	1,0	0,5	27,0
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	1,0	0,5	4,2

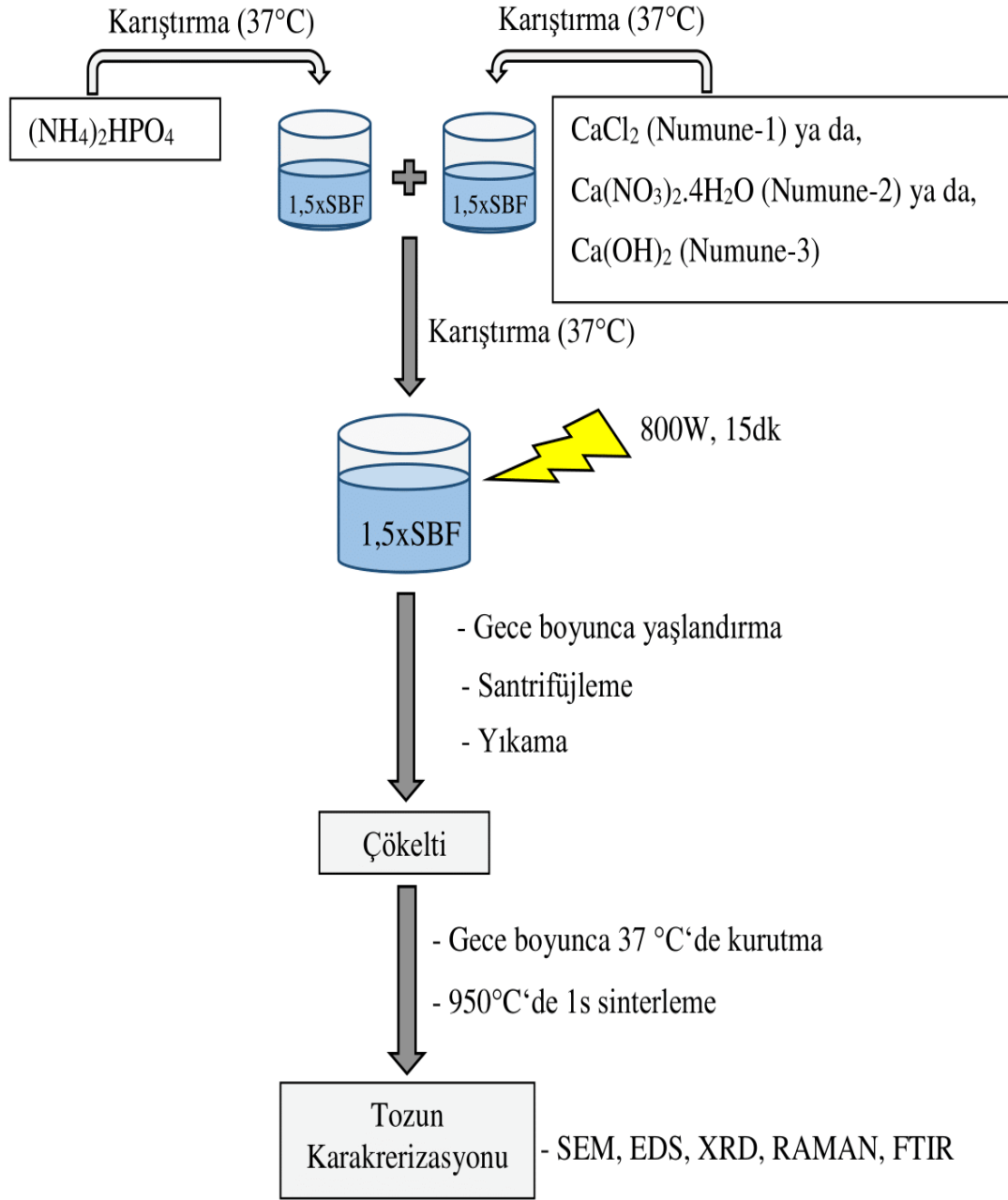
Hazırlanan SBF, sıkıca kapatılmış ve buzdolabında 4°C’de tutulan kapaklı plastik şişede muhafaza edilmiştir. Numune-1, 2, 3, kalsiyum kaynakları olarak sırasıyla 25 mL’lik 1,5xSBF içerisine kalsiyum klorür (CaCl₂), kalsiyum nitrat tetrahidrat (Ca(NO₃)₂.4H₂O), kalsiyum hidroksit (Ca(OH)₂) ilave edilerek hazırlanmıştır.

Fosfat kaynağı olarak tüm solüsyonlarda di-amonyum hidrojen fosfat (NH₄)₂HPO₄ kullanılmıştır ve her kalsiyum kaynaklı solüsyon 25 mL’lik bir hacme sahiptir. Bununla birlikte, 50 mL 1,5xSBF’ye sahip olan Numune-4, herhangi bir kalsiyum ve fosfat kaynağı içermemektedir. Çözeltilerin hazırlanmasından sonra 25 mL kalsiyum ve 25 mL fosfat çözeltileri, 37°C’de homojen 50 mL’lik kalsiyum ve fosfat içeren çözelti elde etmek için manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Son olarak, bu çözeltilerin pH’ı, HCl ve NaOH’in karışıma eklenmesiyle 7,4’e ayarlanmıştır. Numune-1, 2, 3, 4 olarak isimlendirilen çözeltilerin içeriği Tablo 3.2.’de verilmiştir.

Her bir çözelti mikrodalga fırında ayrı ayrı teflon kaplara konulmuştur ve 15 dakika boyunca 800W gücünde mikrodalga ışınlarına maruz bırakılmıştır. Kemik benzeri HA sentezinin genel akış şeması Şekil 3.1.’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Numunelerin isimlendirilmeleri ile Ca ve P kaynakları.

Numune	Başlangıçtaki Ca Kaynağı	Başlangıçtaki P Kaynağı
Numune-1	CaCl ₂	(NH ₄) ₂ HPO ₄
Numune-2	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	(NH ₄) ₂ HPO ₄
Numune-3	Ca(OH) ₂	(NH ₄) ₂ HPO ₄
Numune-4	Yok (1,5xSBF)	Yok (1,5xSBF)



Şekil 3.1. Biyomimetik yöntemle kemik benzeri HA sentezinin akış şeması.

İşlemin sonunda, CO₂ alımını azaltmak için çözeltilere bir gece boyunca kapalı kaplarda yaşlandırma yapılmıştır. Daha sonra çözeltiler üç kez DI-H₂O ile yıkanarak santrifüjleme ile ayrılmıştır.

Elde edilen çökeltiler, 37°C'de kurutulmuştur ve 5°C/dk bir ısıtma hızında 1 saat boyunca 950°C'lik bir sıcaklıkta kalsine edilmiştir.

3.2.2.2. GO indirgenmesinin HA ve TCP oluşumuna olan etkisi çalışması

GO, Hummers ve Offeman yöntemi ile doğal grafit pullarından sentezlenmiştir [180]. Grafit tozu, önden oksitlenmiş grafit elde etmek için %80'lik bir konsantre H_2SO_4 , $K_2S_2O_8$ ve P_2O_5 çözeltisine konulmuştur. Soğutmalı filtreleme ve kurutma işleminden sonra, önden oksitlenmiş grafitin H_2SO_4 ile oksidasyonu ve kademeli olarak 18 g $KMnO_4$ ilave edilmesi ile GO elde edilmiştir. Oksidasyon sırasında karışımın rengi koyu morumsu yeşilden koyu kahverengiye dönüşmüştür. Süspansiyon soğutulmuştur ve 350 mL su ile seyreltilmiştir. Daha sonra, artık permanganatın çözünür manganeyz iyonlarına indirgenmesini sağlamak için gaz çıkışı sona erene kadar H_2O_2 (%30) ilave edilmiştir. GO tekrar tekrar seyreltik 1 M HCl ve deiyonize su (DI- H_2O) ile 4-5'lik bir pH elde edilene kadar metal iyonlarını çıkarmak için yıkanmıştır. Ürün 10000 rpm'de santrifüjleme ile karışımdan ayrılmıştır. Hazırlanan GO numuneleri, 0,5 mg/mL'lik bir süspansiyon oluşturmak için DI- H_2O içinde seyreltilmiştir. Bu süspansiyonlar 1 saat boyunca ultrasonik olarak dağıtılmıştır. R1GO, R2GO ve R3GO (farklı oranlarda indirgenmiş numuneler) elde etmek için, ayrı kaplarda olan 500 mL dağılmış bir GO süspansiyonuna ayrı ayrı 1,89 g, 5,68 g ve 9,46 g $NaBH_4$ ilave edilmiştir. Karışımlar, RGO'ları (R1GO, R2GO ve R3GO) elde etmek için 12 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. RGO'lar süzölmüştür ve 24 saat boyunca 60°C'de kurutulmadan önce nötr pH değerine kadar DI- H_2O ile yıkanmıştır.

GO'da oksijen içeren hidrofilik fonksiyonel grupların biyomineralizasyon süreci üzerindeki etkisi araştırılması için farklı oranlarda indirgenmiş GO numuneleri üzerinde biyomimetik yöntemle biyomineralizasyon gerçekleştirilmiştir. Hızlı biyomineralizasyon oranının elde edilmesi için konsantre miktarlarda başlangıç malzemelerinin DI- H_2O 'ya eklenmesiyle konsantre bir SBF çözeltisi (5xSBF) hazırlanmıştır [179]. Çözelti, Tris ve HCl kullanılarak 37°C'de pH 7,2'de tamponlanmıştır. Farklı oranlardaki RGO ve referans numune (GO) 37°C'deki su banyosunda 3 hafta 5xSBF içerisine daldırılmıştır. 50 mg olan GO ve RGO'ların aynı miktarının her biri için 50 mL 5xSBF kullanılmıştır. 5xSBF içine daldırıldıktan sonra numuneler DI- H_2O ile durulanmıştır ve 24 saat 60°C'de kurutulmuştur.

3.2.2.3. Ti Üzerinde Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Oluşumunda Ön İşlemlerin Karşılaştırılması Çalışması

Saf Ti plakalar #240, 400 ve 800 SiC kâğıdı kullanılarak zımparalanmış ve $10 \times 10 \times 0,5$ mm boyutunda küçük çubuklar halinde kesilmiştir. Daha sonra plakalar, sırasıyla 30°C 'de 15 dakika boyunca aseton, etanol ve su ile ultrasonik olarak temizlenmiştir. Temizlenmiş tüm plakalar, farklı üç ön yüzey işleminin karşılaştırılması için üç gruba ayrılmıştır. Birinci grup 48 saat 5M NaOH, ikinci grup 48 saat 1 N HCl çözeltisinde bekletilmiştir ve üçüncü grup önce 24 saat süreyle 1N HCl'de bekletilmeden önce 24 saat 5M NaOH içine daldırılmıştır. Ön-işlemden geçirilen gruplar DI-H₂O ile durulanmıştır ve 24 saat 37°C 'de kurutulmuştur. Daha sonra bu metal plakalar, su banyosunda 37°C 'de 50 mL 1,5xSBF solüsyonuna daldırılmadan önce 1 saat süreyle 600°C 'de ısıtma işlemi uygulanmıştır. Kapaklı plastik şişe içerisinde 37°C 'de tutulan kaplama çözeltisinde azalan Ca ve P miktarları nedeniyle 1,5xSBF solüsyonu 3 günde bir yenilenmiştir. İlk hafta sonunda optimum ön yüzey işleminin seçilmesinin ardından kaplama 4 hafta sürdürülmüştür ve 1,5xSBF'de bekletilerek kaplama kalınlığının arttığı görülmüştür. Elde edilen kaplamalar 37°C 'de fırında kurutulmuştur ve dördüncü haftanın sonunda $5^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızında 1 saat süreyle 950°C 'de ısıtma işlemi uygulanmıştır.

Ti yüzeylerinde biyolojik tabaka oluşum yeteneklerini araştırmak için hem kimyasal hem de ısıtma işlemi görmüş substratlar 7 gün boyunca SBF'ye daldırılmıştır. Bu çalışmada 1,5xSBF adı verilen 1,5 kat konsantre SBF çözeltisi kullanılmıştır. Toplam 1000 mL'lik bir hacim için 1,5xSBF tarifi Tablo 3.3.'de verilmiştir [179]. SBF çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal reaktifler sodyum klorür (NaCl), sodyum hidrojen karbonat (NaHCO₃), potasyum klorür (KCl), potasyum hidrojen fosfat trihidrat (K₂HPO₄.3H₂O), magnezyum klorür heksahidrat (MgCl₂.6H₂O), kalsiyum klorür (CaCl₂) ve sodyum sülfat (Na₂SO₄). Tablo 3.3.'deki 1,5 kat daha yüksek iyonik konsantrasyona göre DI-H₂O içinde çözülmüştür. 1,5xSBF hazırlanırken, çökelmeyi önlemek için Tris ve 1,0 M HCl kullanılarak nihai pH 7,4'e ayarlanmıştır. Her bir reaktif, 1000 mL hacim tamamlanmadan önce Tablo 3.3.'de verilen sırayla ve miktarda, 700 mL su içinde tamamen çözüldükten sonra reaktifler

ilave edilmiştir. Çözelti hazırlanırken görünür bir çökelti olmamıştır ve hazırlandıktan sonra da berrak ve şeffaf bir halde elde edilmiştir. 1,5xSBF çözeltileri bozulma olmadan bir ay boyunca 4°C’de saklama avantajına sahiptir.

Tablo 3.3. Kullanılan 1,5xSBF çözeltisi için kullanılan kimyasallar ve miktarları [179].

Reaktif	Sıra	Miktar	Formül Ağırlığı
NaCl	1	11,994 g	58,4430 g
NaHCO ₃	2	0,525 g	84,0068 g
KCl	3	0,336 g	74,5515 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	4	0,342 g	228,2220 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5	0,458 g	203,3034 g
1 N HCl	6	60 mL	-
CaCl ₂	7	0,417 g	110,9848 g
Na ₂ SO ₄	8	0,107 g	142,0428 g
Tris	9	9,086 g	121,1356 g
1 N HCl	10	0-5 mL	-

3.2.2.4. Kemik doku mühendisliği için 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA kompozit iskeleler çalışması

10xSBF çözeltisinin hazırlanması için, kullanılan SBF çözeltisi, insan kan plazmasına kıyasla sadece fosfat ve kalsiyum iyonları açısından on kat konsantre edilmiştir. SBF'nin hazırlanması önceki çalışmamızda açıklanmıştır [2]. Kısaca 10xSBF stok çözeltisini hazırlamak için kimyasal reaktifler 700 mL DI-H₂O içinde tamamen çözünmüştür ve 37°C’de manyetik olarak karıştırılmıştır. 10xSBF hazırlanırken, çökelmeyi önlemek için 1,0 M HCl ve Tris kullanılarak pH 6,5’e ayarlanmıştır ve daha sonra çözelti 1000 mL ile tamamlanmıştır. Hazırlanan 10xSBF stok çözelti çökelme olmadan bir aya kadar 4°C’de saklanabilme özelliğine sahiptir.

Karboksil ve hidroksil grubu içeren fonksiyonellendirilmiş MWCNT (fMWCNT) asit oksidasyon işlemi ile hazırlanmıştır. fMWCNT elde etmek için, 1 g MWCNT 2 gün boyunca 130°C’de 200 mL %65 nitrik asit ile reflux edilmiştir. Daha sonra bu karışım DI-H₂O ile seyreltilmiş, süzölmüş ve pH 7’ye ulaşana kadar DI-H₂O ile yıkanmasının ardından 24 saat 50°C’de vakum altında kurutulmuştur.

Süper gözenekli 3B Col/fMWCNT/CS iskelesinin hazırlanması için öncelikle Col hidrojel asetik asit içinde fibril Col'ün homojenleştirilmesiyle üretilmiştir. Col çözeltisi matris içerisinde fMWCNT'lerin homojen dağılımı için pH 3'e ayarlanmıştır. Tüm yapı iskelelerinin Col konsantrasyonları 0,05 g/mL asetik asit çözeltisi (%5 ağ./hac.) şeklinde ayarlanmıştır. fMWCNT ve CS, aynı konsantrasyonlarda Col çözeltisine ilave edilmiştir (Col'e göre %4,0 ağ., %0,2 ağ./hac.). En iyi hücre etkileşimleri [181], antimikrobiyal etkiler [182] ve mekanik özellikler [183] gösterdiği için fMWCNT ve CS oranları %0,2 (ağ./hac.) olarak seçilmiştir. Tip-I Col, fMWCNT ve CS'nin hesaplanan miktarlarına 0,1 M asetik asit ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Col ihtiva eden numunelerin homojen dağılımını sağlamak için buz banyosu içinde 4°C'de 6 saat şiddetli bir şekilde karıştırılırken, sadece CS içeren kontrol numunesi ortam sıcaklığında karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltiler, 1 saat boyunca buz banyosunda hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için sonike edilmiş ve liyofilizasyon öncesi 4°C'de saklanmıştır. Çözelti 12'li kültür kaplarına 2 şer mL olacak şekilde aktarılmıştır. Jelin 0,9°C/dk'da -40°C'ye soğutularak dondurulmasının ardından buz kristalleri 48 saat 200 mtorr'lik vakumda 0°C'de liyofilizasyon ile süblimleştirilerek uzaklaştırılmıştır. Üretilen 3B iskele materyalleri 0,05 M NaOH/etanol karışımı ile yıkanmasının ardından DI-H₂O/etanol (7:3) karışımı ile yıkanarak nötralize edilmiştir ve tekrar 48 saat süreyle liyofilizasyona tabi tutulmuştur.

HA'nın yapı iskelesi üzerinde biyomineralizasyonu biyomimetik sentez yöntemi kullanılarak bir kemik yapı iskelesi hibrit malzemesi (Col/fMWCNT/CS/HA) geliştirilmiştir. Biyomimetik olarak HA çekirdeklendirilmiş yapı iskelelerinin (Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS) hazırlanması için 10xSBF çözeltisi kullanılmıştır. Hızlı HA çekirdeklenme oranlarına ulaşmak için konsantre SBF çözeltisi (10xSBF) kullanılmıştır. Tüm yapı iskeleleri gözenekler ile 10xSBF çözeltisi arasında temas kurmak için vakum ortamı kullanılarak SBF ortamında çökeltilmiştir. Daha sonra yapı iskeleler 50 mL 10xSBF çözeltisine daldırılmıştır. Bir hafta boyunca daldırma işleminin ardından yapı iskeleleri solüsyondan alınmıştır ve suda çözünebilir minerallerin uzaklaştırılması için DI-H₂O ile birkaç kez ve dikkatli bir şekilde durulanmıştır.

3.2.2.5. Yeni m-5xSBF'de monofazik brushitin Ti6Al4V üzerine biyomimetik yöntemle kaplaması çalışması

m-5xSBF ve 5xSBF'nin hazırlanması için öncelikle Tablo 3.4.'de özetlendiği gibi insan kan plazmasındaki inorganik kompozisyonun değiştirilmesiyle iki ayrı SBF ortamı elde edilmiştir. Sodyum klorür (NaCl), sodyum hidrojen karbonat (NaHCO₃) potasyum hidrojen fosfat trihidrat (K₂HPO₄.3H₂O), potasyum klorür (KCl), magnezyum klorür hekzahidrat (MgCl₂.6H₂O), kalsiyum klorür (CaCl₂) sodyum sülfat (Na₂SO₄), tris(hidroksimetil)-3-aminometan [Tris, (CH₂OH)₃CNH₂] ve hidroklorik asit (HCl) SBF'nin hazırlanması için kullanılmıştır. Bu iki SBF çözeltisi, tuzların 1000 mL DI-H₂O'da çözülmesiyle hazırlanmıştır ve Tris ile HCl kullanılarak 37°C'de pH 6'da tamponlanmıştır. Daha önce açıklandığı gibi [179] SBF'nin hazırlanması sırasında tüm kimyasallar sırayla eklenmiş ve bir önceki çözüldükten sonra yenisi ilave edilmiştir. 5xSBF ve m-5xSBF'nin hazırlanması normal SBF'deki iyon konsantrasyonlarının değiştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmiş SBF çözeltisi (m-5xSBF) normal SBF'ye göre yalnızca K₂HPO₄.3H₂O ve CaCl₂ tuzlarının 5 kat konsantre edilmesi ile hazırlanırken; 5xSBF çözeltisi ise normal SBF içerisindeki tüm tuzların 5 kat konsantre edilmesiyle hazırlanmıştır.

Tablo 3.4. İnsan kan plazması (HBP), normal SBF, kullanılan 5xSBF ve m-5xSBF çözeltilerinin iyon konsantrasyonları (mM).

İyon	İyon Konsantrasyonları (mM)			
	HBP	SBF	5xSBF	m-5xSBF
Na ⁺	142,0	142,0	710,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0	25,0	5,8
Mg ²⁺	1,5	1,5	7,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5	12,5	12,5
Cl ⁻	103,0	147,8	739,0	168,9
HCO ₃ ⁻	27,0	4,2	21,0	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0	5,0	5,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5	2,5	0,5
pH	7,2-7,4	7,40	6,0	6,0

Biyomimetik proses için Ti6Al4V alaşımı (Grade 5) 3×3×0,45 cm'lik şeritler halinde kesilmiş ve biyomimetik kaplama için substrat olarak kullanılmıştır. Alınan Ti6Al4V

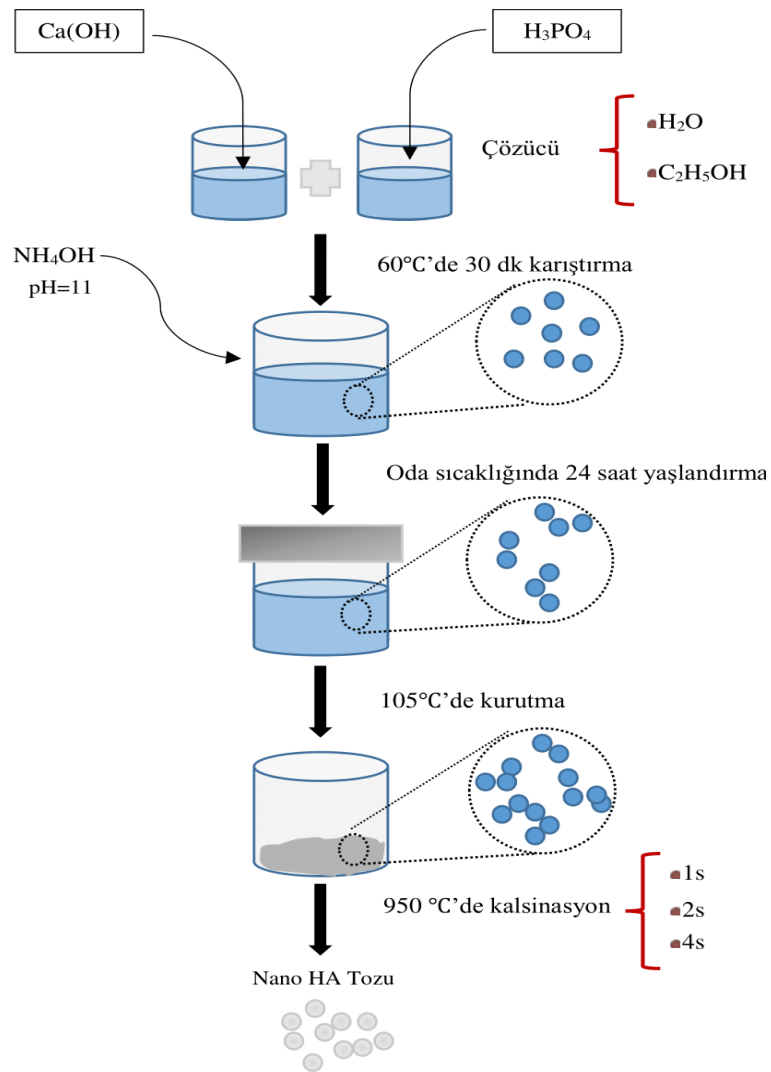
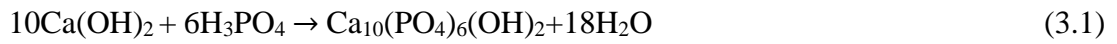
plaka örnekleri, etching işleminden önce pürüzlendirilmiştir. Numuneler 600 ve 800 derece SiC kâğıdı ile pürüzlendirilmiş ve daha sonra Ti6Al4V substratları 15 dakika boyunca sırasıyla aseton, 70 etanol ve DI-H₂O ile ultrasonik olarak temizlenmiştir. Temizleme işleminin ardından substratlar 60°C’de 24 saat boyunca 5M NaOH etching çözeltisi ile ve daha sonra 1 saat boyunca 600°C’de termal işlem ile muamele edilmiştir. Bu prosedür, Ti6Al4V yüzeylerinin sodyum titanat ve titanyum oksit tabakası ile (Na-Ti numuneleri) kaplanarak metalik yüzeyin aktivasyonunu sağlamak için kullanılmıştır. Bu ön yüzey işleminden sonra Ti6Al4V plakaları önceden tarif edildiği gibi iki farklı grup halinde hazırlanan çözeltiler içine 37°C’de 24 ve 48 saat boyunca batırılmıştır. Çözeltiler, açık havadan gelebilecek olan kirlenmeyi veya reaksiyonu önlemek için kapalı bir kaptaki tutulmuştur. Biyomimetik yöntem sonrası plakalar DI-H₂O ile yıkandıktan sonra 60°C’lik bir fırında gece boyunca kurutulmuştur.

3.2.2.6. Çözelti ve kalsinasyon süresinin Sol-Jel Hidroksiapatit sentezi üzerine etkisi çalışması

Kalsiyum ve fosfat başlangıç maddeleri olan Ca(OH)₂ ve H₃PO₄, farklı koşullar altında sentezlenmiş olan HA elde etmek için kullanılmıştır. Başlangıç maddelerinin karışımları, 1,67’ye eşit olan katkılanmamış HA’nıninkine benzer bir Ca/P atomik oranı göz önüne alınarak hazırlanmıştır. Bu amaçla çözeltilerin hazırlanması için 1,85 g kalsiyum kaynağı olan Ca(OH)₂ 25 mL DI-H₂O ve 25 mL etanolde (C₂H₅OH) ayrı ayrı çözülmüştür. Benzer şekilde 0,87 mL H₃PO₄ içeren iki ayrı fosfat çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan her çözelti, kapalı kaplarda 60°C’de 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. HA’nın sentezi, kapalı kaplarda gerçekleştirilmiştir, çünkü HA içeriğinin önceki çalışmalarda belirtildiği gibi sentez aşamasında açık atmosferden etkilendiği bilinmektedir [184]. Hazırlanan su ve etanol içeren kalsiyum çözeltileri, su ve etanol bazlı sol-jel tekniği için aynı koşul altında ayrı ayrı 60°C’de 30 dakika karıştırılarak önceden hazırlanan su ve etanol içeren fosfat çözeltilerine damla damla ilave edilmiştir. HA sol-jel yöntemiyle sentezlenirken başka bir çalışmada [185] kullanıldığı gibi (pH=9) farklı pH değerleri kullanılabilir. HA bileşiminde OH⁻ içeriği olması nedeniyle sentez sırasında alkali ortam önemlidir ve bu çalışmada her iki çözelti

için pH amonyum hidroksit (NH_4OH) kullanılarak ayarlanmıştır. Sentez akış diyagramı Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.

Solüsyonlar 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yaşlandırılan numuneler, beyaz kuru jeller elde edilinceye kadar fırınında 105°C 'de ısıtılma tabi tutulmuştur. Kurutulan tozlar agat havanda öğütülmüştür. HA oluşumu ile sonuçlanan kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ve fosforik asit (H_3PO_4) arasındaki kimyasal reaksiyon denklemi şu şekildedir:



Şekil 3.2. Hidroksiapatit hazırlanışının akış şeması.

Her iki kurutulmuş jel üç gruba ayrılmıştır ve ayrı ayrı fırında sırasıyla 950°C'de 1 saat, 2 saat ve 4 saat süreyle kalsinasyon işlemine tabi tutulmuştur ve ortam sıcaklığına inmesi için soğutmaya bırakılmıştır. Elde edilen tozlar HA1, HA2, HA3, HA4, HA5 ve HA6 olarak etiketlenmiştir. HA1-HA2-HA3 su bazlı çözelti için sırasıyla 1 saat, 2 saat ve 4 saat süreyle kalsine edilirken HA4-HA5-HA6 ise etanol bazlı çözelti için sırasıyla 1 saat, 2 saat ve 4 saat boyunca kalsine edilmiştir.

3.2.2.7. Ag, Zn veya Co katkılı HA'nın biyomimetik sentezi ve fonksiyonel Ti üzerinde Ag, Zn veya Co katkılı HA/fMWCNT kompozitinin kaplanması çalışması

Katkılanmamış ve Ag, Zn veya Co katkılı HA'nın biyomimetik sentezleri için katkılanmamış HA, önceki çalışmamızda açıklandığı şekilde elde edilen SBF kullanılarak biyomimetik metotla hazırlanmıştır [1]. SBF'yi oluşturan tuzlar, sürekli karıştırma altında 37°C'de 1000 mL DI-H₂O içinde çözülmüştür. 37°C'deki çözelti ortamının nihai pH'ı Tris ve 1M HCl tamponu ile 7,2 olarak ayarlanmıştır. Tablo 3.5.'de gösterildiği gibi hazırlanan 1,5xSBF'deki kalsiyum ve fosfat konsantrasyonu iki kat olarak hazırlanmış ve bu çözelti c1,5xSBF olarak adlandırılmıştır.

Tablo 3.5. Hazırlanan SBF, 1,5xSBF ve c1,5xSBF ortamlarındaki iyon konsantrasyonları.

İyon (mM)	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Ag ⁺ Zn ²⁺ Co ²⁺
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	1,0	0,5	4,2	-
1,5xSBF	213,0	7,5	2,25	3,75	221,7	1,5	0,75	6,3	-
c1,5xSBF	213,0	10,5	2,25	7,5	229,2	3	0,75	6,3	1,0

Ag⁺, Zn²⁺ veya Co²⁺ katkılı HA'nın sentezlenmesi için diğer üç çözelti CaCl₂'nin eklenmesinden önce c1,5xSBF'ye sırasıyla AgNO₃, Zn(NO₃)₂.6H₂O veya Co(NO₃)₂.6H₂O tuzlarını ekleyerek hazırlanmıştır. SBF, 1,5xSBF ve c1,5xSBF çözeltilerinin iyonik konsantrasyonları Tablo 3.5.'de verilmiştir. Kompozitlerdeki metal iyonlarının miktarı, başlangıç ortamındaki öncüllerin konsantrasyonu ile kontrol edilebilir. Bu çalışmada katkı iyonların konsantrasyonları Tablo 3.5.'de gösterildiği gibi 1 mM olarak seçilmiştir. Hazırlanan çözeltiler nötralleşme reaksiyonundan sonra

2 saat 37°C'de manyetik karıştırıcı (250 rpm) kullanılarak karıştırılmaya devam edilmiş ve daha sonra inorganik fazın çökmesini sağlamak için kapalı bir kapta çalkalamalı su banyosu kullanılarak 14 gün 37°C'de bekletilmiştir.

Ürünlerin reaksiyon çözeltisinden santrifüjlenerek toplanmasının ardından Na⁺ ve Cl⁻ gibi çözünen tuzların uzaklaştırılması için birkaç kez DI-H₂O ile yıkanmıştır ve 80°C'de 24 saat süreyle kurutulmuştur. Son olarak, kurutulmuş numuneler karakterizasyon öncesi agat havan ile öğütülerek hazırlanmıştır.

İşlem görmemiş CNT'ler süper hidrofobiktir ve sulu ortamda kolayca agregolabilirler. Ancak oksidasyon yani fonksiyonellendirilme polar grupların bağlanmasından dolayı dispersiyonu artırır ve ayrıca biyolojik uygulamalar için yüzey aktivasyonunu da sağlar. CNT'ler biyolojik ortamda kimyasal olarak fonksiyonellendirilmeleri ile toksik olmayan etkilere sahip hale gelmektedirler [75]. CNT'ler üzerindeki oksidasyon işlemi sırasında yeni oluşturulan veya var olan kusurlar, CNT duvarlarındaki fonksiyonel grupların (COOH ve OH) ikamesinde önemli bir rol oynar. CNT'lerin fonksiyonel gruplarla fonksiyonellendirilmesi sadece homojen dağılmayı teşvik etmekle kalmayıp aynı zamanda HA ve CNT'ler arasındaki etkileşimi de artırmaktadırlar.

Bu nedenle tez kapsamında yapılan araştırmada MWCNT yüzeyinde -OH ve -COOH oksijen içeren fonksiyonel grupları 130°C'de hacimce 3:1 oranında derişik H₂SO₄ ve HNO₃ çözelti karışımında altı saatlik reflux sonrasında üretilmiştir. Filtreleme işleminden sonra, negatif yüzey yüklü fMWCNT nötr pH olana kadar DI-H₂O yıkanmıştır. Bu yöntem HA partiküllerinin katyonları ile CNT'lerin fonksiyonel grupları arasındaki kimyasal bağlanma (-COO-Ca-OOC-) için uygundur ve ayrıca CNT'lerin kompozit içerisinde dağılımı da iyileştirilmiştir.

Ayrı fazların homojen dağılımı kompozit sistemlerin performansında önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek yüzey enerjisi ve yüksek en-boy oranı nedeniyle CNT'lerin bir araya gelme eğilimi için dispersiyon önemli bir olgudur.

*f*MWCNT/Ag, Zn veya Co katkılı HA kompozitlerinin hazırlanması basamağında homojen dağılım elde etmek için *f*MWCNT/HA ve *f*MWCNT/katkılı HA kompozitleri etil alkol içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır. Katkılı HA (0,2 g) ve 0,02 g *f*MWCNT (ağırlıkça %10), bir hafta boyunca ortam sıcaklığında 250 rpm'de karıştırılmıştır. Filtrelenen kompozitler bir gün boyunca 100°C'de kurutulmuştur.

Ti yüzey fonksiyonellendirilmesi aşaması için öncelikle Ti substratları zımparalanmıştır ve fonksiyonellendirme öncesi temizlenmiştir. Ti alaşımı 10×10×0,5 mm'lik küçük şeritler halinde kesilmiştir. Diğer işlemlerden önce, tüm yüzeyler mekanik olarak 800 dereceye kadar SiC kâğıtla zımparalanmıştır. Substratların zımparalanmasının ardından safsızlıkların giderilmesi için DI-H₂O, aseton ve alkol ile sırayla ultrasonik olarak temizlenmiş ve bağlayıcı tabaka immobilizasyonundan önce 60°C'de kurutulmuştur. Ti numunelerinin reaktif kısımlar olarak okshidril ve amin grupları ile fonksiyonellendirilmeden önceki halleri pristine (işlem görmemiş) Ti olarak adlandırılmıştır. Daha sonra saf Ti nihai kompozit kaplama öncesi iki aşamalı fonksiyonellendirmeye tabi tutulmuştur: alkali işlem ve silanizasyon.

Alkali işlem: Alkali işlem yüzey aktivitesini arttırmada ve sonraki adımlardaki kovalent bağ için okshidrillerin yerleştirilmesinde etkili bir yöntemdir. Alkali işlem Ti yüzeylerinde -OH grupları ve silan bağlanma ajanı olan APTES ile Ti arasında kimyasal bir bağ oluşturur. Ecth edilmiş (Alkali işlem görmüş) numuneler 50 mL 5 M NaOH içinde 60°C'de 24 saat boyunca bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Ecth edilmiş numuneler DI-H₂O ile durulanmıştır ve gece boyunca 40°C'de hava atmosferinde 24 saat kurutulmuştur.

Silanizasyon: Kompozitlerin immobilizasyonunda gerekli olan amin gruplarını oluşturmak için numuneler 3-aminopropil trietoksisilan ile silanize edilmiştir. Silanizasyonda, APTES [(CH₃CH₂O)₃Si-NH₂] ecth edilmiş Ti yüzeylerindeki -OH ve CH₃CH₂O grupları arasında birleştirme tepkimesiyle oluşan Si-O-Ti bağları sayesinde Ti yüzeyiyle bağlanmıştır. Siloksan bağlanma katmanları alkali işlem görmüş Ti substratlarının tolüen (%1 hacim) içerisindeki 50 mL APTES çözeltilerine 70°C'de 24 saat daldırılması ile hazırlanmıştır. Daldırma işleminden sonra, 15 dakika boyunca

serbest haldeki siloksan partiküllerini gidermek için substratlar kuru tolüen içinde sonike edilmiştir. Ardından havada kurutulan numuneler Ti ile silan arasındaki hidrojen bağlarını kovalent Si-O bağlarına dönüştürmek için 2 saat 110°C'de bekletilmiştir. Böylece APTES bağlayıcısı vasıtasıyla Ti yüzeyine kovalent olarak bağlanan uç amin grupları nedeniyle yüzey pozitif olarak yüklenmiştir. Negatif yüklü nano kümeler Coulombic çekim yoluyla ve hidrofobik etkileşim ile substrat üzerindeki pozitif yüklü amin (-NH₂) grupları ile kuvvetli bir şekilde bağlanma afinitesine sahiptir.

*f*MWCNT/Ag, Zn veya Co-katkılı HA kompozitlerinin amin fonksiyonellendirilmiş Ti substratlarına immobilizasyonu çapraz bağlanma işlemi ile gerçekleştirilmiştir. 0,2 g kompozitin 2 saat boyunca pH 6'daki PBS tamponunda sonike edilmesinin ardından oda sıcaklığında EDC/NHS çözeltisinde (0,2 M EDC ve 0,5M NHS) orbital çalkalayıcı kullanılarak 270 rpm'de gece boyunca çapraz bağlanmıştır. Bu işlem *f*MWCNT'deki karboksil gruplarının EDC ile aktivasyonunun gerçekleşmesi için yapılmıştır. Sonraki adımda EDC/NHS ile aktive edilmiş *f*MWCNT/Ag, Zn veya Co katkılı HA kompozitlerinin APTES fonksiyonellendirilmiş Ti yüzeylerine bağlanması gerçekleştirilmiştir.

Siloksan bağlanma tabakasını taşıyan Ti substratları EDC/NHS çözeltisi varlığındaki %0,1 ağırlık hac. sulu *f*MWCNT/Ag, Zn veya Co-katkılı HA kompozit çözeltisine daldırılmıştır ve ardından oda sıcaklığında 24 saat boyunca reaksiyona girmesine izin verilmiştir. Reaksiyonun ardından *f*MWCNT/Ag, Zn veya Co-katkılı HA kaplı substratlar fiziksel olarak adsorbe edilmiş kompozitin uzaklaştırılması için sürekli çalkalama ile DI-H₂O'da 30 dakika boyunca durulanmıştır ve sonrasında kurutulmuştur.

Bu nedenle kompozitler *f*MWCNT'nin -COOH grupları ile Ti yüzeyinin -NH₂ grupları arasındaki reaksiyonu yoluyla amin fonksiyonellendirilmiş Ti yüzeyine immobilize edilmiştir. Numuneler daha sonraki karakterizasyon adımları için kapalı bir petri kabında saklanmıştır.

3.2.2.8. Kanser tedavisine yönelik uyarana duyarlı akıllı ilaç dağıtım sistemi olarak NCQDs bazlı enjekte edilebilir, kendiliğinden çapraz bağlanan ve yerinde oluşan yeni çok fonksiyonlu hidrojel çalışması

NCQDs sentezi için yeşil ve kullanışlı olan yağ banyosu stratejisi [186] kullanılmıştır. Isıtılmış yemeklik yağa (20 mL, 250°C) 10 g sükröz ve 2 g üre karışımı ilave edilmesinin ardından 5 dakika boyunca mekanik karıştırma ile karışımın renginin beyazdan koyu kahverengiye dönmesi NCQDs oluşumunu göstermiştir. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra reaksiyon sistemine 30 mL DI-H₂O ilave edilmiştir. Sentezlenen NCQDs sulu faza aktarılmış ve topaklanmış partiküllerin uzaklaştırılması için 11000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlenmesi sonucu sarı-kahverengimsi süpernatant elde edilmiştir.

Üst yağ, bir ayırma hunisi ile çıkarılmıştır ve sonraki sentezler için tekrar kullanılmıştır. Sulu çözeltide sentezlenen NCQDs, daha fazla kullanım için 4°C'de saklanmıştır ve katı kahverengimsi NCQDs elde etmek için liyofilize edilmiştir.

HA hazırlanması önceki çalışmamızda açıklanmıştır [1]. Kısaca HA önceden hazırlanmış olan 1,5xSBF'nin 800W mikrodalgaya 15 dakika süreyle maruz bırakılmasıyla sentezlenmiştir. Daha sonra SBF santrifüj ile ayrılmış ve pH nötr hale gelene kadar DI-H₂O ile yıkanmıştır. Elde edilen HA tozları 37°C fırında kurutulmuştur ve nihai HA'yı elde etmek için 5°C/dk'lık bir ısıtma hızında 950°C ısıtma işlemi 1 saat süre ile tabii tutulmuştur ve kullanımdan önce bir vakumlu kurutucuda saklanmıştır.

pH duyarlı hibrit hidrojellerin üretimi aşamasında öncelikle hidrojel öncü çözeltisi elde etmek için NCQDs, Dox ve HA ayrı ayrı çözülmüş ve DI-H₂O'da istenen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır (Tablo 3.6.). Çeşitli konsantrasyonlarla Dox ve HA konjuge NCQDs bazlı pH duyarlı akıllı hidrojellerin üretimi için üç farklı öncü konsantrasyon kullanılarak gerekli NCQDs konsantrasyonu ayarlanmıştır.

Tablo 3.6. Hazırlanan hidrojel numunelerinin formülasyonları.

Hidrojel	Bileşenler, %		
	NCQDs (ağ./hac.)	Dox (ağ./hac.)	HA (ağ./hac.)
NCQDs-1	0,4	-	-
NCQDs-2	0,6	-	-
NCQDs-3	0,8	-	-
NCQDs/Dox-1	0,6	0,1	-
NCQDs/Dox-2	0,6	0,2	-
NCQDs/Dox-3	0,6	0,4	-
NCQDs/Dox	0,6	0,2	-
NCQDs/Dox/HA-1	0,6	0,2	0,1
NCQDs/Dox/HA-2	0,6	0,2	0,2
NCQDs/Dox/HA-3	0,6	0,2	0,4
NCQDs/Dox/HA	0,6	0,2	0,2
NCQDs/Dox-1/HA-1	0,6	0,1	0,1
NCQDs/Dox-2/HA-2	0,6	0,2	0,2
NCQDs/Dox-3/HA-3	0,6	0,4	0,4

Dox'un pH'a karşı duyarlı salınımını sağlayan bu konjüгатlar NCQDs amin grubu ile Dox keton grubu arasında asidik kanser hücresi mikro ortamı ile uyarılabilen Schiff bazıyla kimyasal olarak konjüğe edilerek hazırlanmıştır. Ek olarak, fonksiyonel terminal grupları içeren NCQDs ve HA [$Ca_5(PO_4)_3OH$] hidroksil ve amin arasındaki kovalent reaksiyonla konjüğe edilebilirler. Önceden belirlenmiş miktarlarda hazırlanmış NCQDs çözeltileri farklı derişimlerdeki Dox çözeltilerine damla damla karanlıkta ilave edilerek farklı formülasyonlar elde edilmiştir. Daha sonra, Schiff bazı reaksiyonu oda sıcaklığında kuvvetli bir şekilde karıştırılarak 12 saat karanlıkta sürdürülmüştür. Ayrıca HA içeren hidrojellerin (NCQDs/Dox/HA) hazırlaması için farklı miktarlarda alınan HA ilk olarak 30 dakika boyunca 10 mL sulu çözelti içinde ultrasonik olarak dağıtılmıştır. NCQDs çözeltisine farklı miktarlarda dağılmış olan HA çözeltisinin ilave edilmesinin ardından NCQDs/HA karışımına Dox çözeltisi ilave edilmiştir.

Sulu NCQDs bazlı hibritleri homojenleştirmek için NCQDs/Dox/HA dispersiyonu oda sıcaklığında 5 dakika süreyle sonike edilmiştir. HA içermeyen hidrojeller için Schiff bazı reaksiyonu yukarıda tarif edildiği gibi sürdürülmüştür. Fiziksel ve kimyasal (Schiff bazı) çapraz bağlı pH duyarlı hibrit hidrojeller elde etmek için karışımlar 37°C'de su banyosuna yerleştirilmiştir. Soğutulan vida kapaklı şişelerindeki

hidrojeller karakterizasyonlar öncesi 4°C’de buzdolabında saklanmıştır. Hazırlanan çapraz bağlanmış hidrojellerin nihai bileşimleri Tablo 3.6.’da tarif edilmiştir. İlaç konjuge hidrojelin yerinde oluşmasının ardından Dox’un hidrojellerden in-vitro serbest bırakılmasının incelenmesi için su banyosunda bulunan her bir numune şişesine farklı pH değerinde 2 mL taze salınım ortamları ilave edilmiş ve tüm deney süresi boyunca fizyolojik vücut sıcaklığında (37°C) ve hafif çalkalama hareketi (20 rpm) altında bekletilmiştir. NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA hidrojellerinden Dox salınımının pH bağımlılığı kan, kanser hücreleri ve endozomların pH ortamını taklit etmek için farklı pH koşulundaki (pH=7,4; 6,5; 5,5 ve 4,0) tampon çözeltilerinde inkübasyon süresinin bir fonksiyonu olarak izlenmiştir.

Belirtilen zaman noktalarında numune şişelerinden 2 mL salınım ortamı analiz için çıkarılmıştır ve bu arada salınım ortamı hacminin sabit kalması için aynı pH değerinde taze 2 mL’lik tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Salınım ortamındaki Dox konsantrasyonu 487 nm absorbansta kuvars küvet (yol uzunluğu 1,0 cm) kullanılarak UV-Vis spektrofotometre ile 0-72 saat arasında farklı zaman noktalarında analiz edilmiş ve serbest bırakılan toplam Dox miktarı oluşturulan standart bir kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır. İlacın kalibrasyon eğrisi tampon çözeltilerinde benzer koşullar altında hazırlanan seri Dox konsantrasyonlarının (50 ila 0,01 µg/mL arasında değişen) absorbans verileri kullanılarak belirlenmiştir. Tüm ilaç salınım sonuçları tekrarlanan üç testin ortalama değeri olarak çizilmiştir ve standart sapmalarla birlikte ortalama değerler grafikte verilmiştir. Tüm işlemler ışık engellenmiş koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Serbest bırakma ortamı önceden belirlenmiş zaman aralığında değiştirilmiş ve sırayla 1, 2, 3,... m,..., n olarak numaralandırılmıştır. Biriken ilaç salınımı yüzdesi (DR) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$DR (\%) = \frac{\sum_{i=1}^m C_i \cdot V_i}{\sum_{i=1}^n C_i \cdot V_i} \times 100\% \quad (3.2)$$

Burada , C_i ve V_i sırasıyla i. kuvars hücredeki Dox konsantrasyonunu ve salınım ortamının hacmini temsil etmektedir.

3.2.3. Karakterizasyon ve Testler

3.2.3.1. Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak hidroksiapatitin mikrodalga destekli biyomimetik sentezi çalışması

Sentezlenen kemik benzeri HA tozlarının yapısı SEM, EDS, XRD, Raman ve FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Sentezlenmiş ve ısı işlem görmüş HA tozlarının morfolojileri SEM ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen numunelerin elementel bileşimleri EDS alan analizi ile yorumlanmıştır. XRD analizi sentezlenen toz numunelerin fazlarının aydınlatılması için kullanılmıştır.

XRD verileri kullanılarak hesaplanan numunelerin kristalin boyutu, kristal yoğunluğu ve kristallenme oranı Tablo 4.2.'de verilmiştir. HA kristal boyutu (D) Debye-Scherer eşitliği ile hesaplanmıştır [44]:

$$D = \frac{k\lambda}{B_{1/2} \cos\theta} \quad (3.3)$$

, burada k şekil faktörü (0,94), λ Cu K α ışınımına ait dalga boyu (0,154059 nm), θ Bragg açısı ve $B_{1/2}$ maksimum pik yoğunluğunun yarı genişliğidir. Tablo 4.2.'de verilen HA fazlarının ICDD sayılarına göre Numune-1, 2, 3 ve 4 için en güçlü piklerin miller indeksleri (hkl) sırasıyla (221), (121), (211) ve (211)'dir. HA kristalinitesi (X_c) aşağıdaki eşitlik ile belirlenmiştir [187]:

$$X_c = \left(\frac{0,24}{\beta}\right)^3 \quad (3.4)$$

, burada β pikin yarı yüksekliğinin genişliğidir. Numune yoğunlukları (D) şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$D = (W \times Z) / (V \times 0,6022169) \quad (3.5)$$

, burada Z her bir hücredeki formül biriminin sayısı, W formül kütlesi ve V hücre sabitlerinden hesaplanan hacimdir [188].

Raman ve FTIR analizi HA yapılarında bulunan gruplara ait piklerin varlığının belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.2.3.2. GO indirgenmesinin HA ve TCP oluşumuna olan etkisi çalışması

Sentezlenmiş ürünlerin morfolojisi ve mikro yapısı SEM ile karakterize edilmiştir. EDS analizi ile belirlenen sentezlenmiş malzemelerdeki elementler karakterize edilmiştir. EDS'teki bütün sinyaller atom numarası, soğurma ve flüoresans (ZAF düzeltme rutini) için düzeltilmiştir.

Ölçülen sonuçlar, referans malzemeler olarak ekstra saf TCP (Sigma Aldrich, CAS: 7758-87-4) ve HA (Sigma Aldrich, CAS: 12167-74-7) kullanılarak kalibre edilmiştir. Analiz için numunelerdeki bileşimler ölçülen X-ışını yoğunluklarından aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır:

$$W. \% = \frac{k}{Z.A.F} \times 100 \quad (3.6)$$

$$k = \frac{I^{Meas}}{I^{Ref}} \quad (3.7)$$

, burada Z, A ve F sırasıyla atom numarası etkisini (durdurma gücü ve geri saçılma etkisi), emme etkisini ve floresan etkisini açıklayan matris düzeltme parametreleridir. I^{Meas} ve I^{Ref} sırasıyla ilgili elementin ölçülen ve referans yoğunluklarıydı [189].

Sentezlenmiş GO-HA hibrit kompozitlerin faz karakterizasyonu XRD ile analiz edilmiştir ve TGA analizi azot atmosferi altında 10°C/dk ısıtma hızıyla alümina potada gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin ıslanabilirliği ve hidrofiliği video tabanlı temas açısı cihazı kullanılarak temas açısının ölçülmesi ile karakterize edilmiştir. FTIR 4 cm^{-1} çözünürlük ile analizi 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin UV-Vis spektrumları UV-Vis spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. DI-H₂O'da dispers edilmesinin ardından GO'nun dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyel ölçümleri nötr pH'da gerçekleştirilmiştir. Sentezlenmiş GO'nun yüzey alanı ölçümleri 77 K'de N₂'nin fiziksel adsorpsiyonu ile gerçekleştirilmiştir ve yüzey alanı BET yöntemi ile elde edilmiştir.

3.2.3.3. Ti üzerinde biyomimetik yöntemle hidroksiapatit oluşumunda ön yüzey işlemlerin karşılaştırılması çalışması

Saf Ti plakalarının 1,5xSBF'deki ilk hafta sonunda, NaOH, HCl ve NaOH+HCl ön yüzey işlemleri uygulaması sonrası SEM analizi ile yüzeyler morfolojik olarak incelenmiştir. NaOH, HCl ve NaOH+HCl ile ön yüzey işlemleri Ti yüzeylerin 1,5xSBF'deki ilk hafta sonunda ve dördüncü hafta sonunda kaplanan bifazik HA tozlarının elementel analizi EDS alan taraması ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca dördüncü hafta sonunda kaplanmış numunenin ara kesitinin elementel karakterizasyonu için EDS haritalaması yapılmıştır.

EIS çalışmaları 5 mV'lik pertürbasyon genliğinde ve 10⁰-10⁵ Hz frekans aralığında gerçekleştirilmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır ve sonuçlar mevcut yazılım tarafından kaydedilmiştir. EIS kaplanmış numunelerin hem direnç hem de kapasitif davranışları hakkında bilgi sahibi olmak için kullanılan analiz yöntemlerinden biridir [190]. SBF çözeltilerinde NaOH+HCl, NaOH ve HCl işlemleri için açık devre potansiyeli durumunda Nyquist ve Bode grafikleri elde edilmiştir.

Daha önce bahsedildiği şekilde elde edilen kaplanmış numunenin kristal boyutu, kristalinitesi ve yoğunluğu XRD verilerinden bulunmuştur. FTIR analizi 4 cm^{-1} çözünürlük ile 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

1,5xSBF’de elde edilen kaplanmış bifazik HA tozlarının ortalama partikül boyut analizleri 1 saat boyunca sonike edilerek suda dağıtılmalarının ardından gerçekleştirilmiştir. Sinterleme öncesi ve sonrası hazırlanan numunelerin uygun seyreltmedeki çözeltileri ölçüm küvetine aktarılmış ve partikül boyut analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4. Kemik doku mühendisliği için 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA kompozit iskeleler çalışması

Hazırlanan yapı iskelelerinin mikroyapılarını analiz etmek ve elementel bileşimlerini belirlemek için SEM ve EDS analizleri gerçekleştirilmiştir. Kompozit yapı iskeleleri uygun ebatlarda kesilerek yapışkan karbon bantla sabitlenmesinin ardından yüzeyde iletkenliğin sağlanması için otomatik püskürtme kaplayıcısında (Polaron CS7620) altın film (2 nm) biriktirilmiştir. SEM görüntülerinin analizi ile saptanmış olan yapı iskelelerinin ortalama gözenek boyutları kısa eksen ve uzun eksen boyunca dikey yönde belirlenmiştir. Ortalama değerler hesaplanmış ve ortalama gözenek boyutu olarak alınmıştır. Ayrıca, hazırlanan iskelelerin optik görüntüsü optik mikroskop kullanılarak elde edilmiştir.

Yapı iskelelerinin fazları 40 kV, 30 mA ve adım boyutu $0,04^\circ$ ’de çalışan Cu K α radyasyonu ($\lambda=0,154059$ nm) ile kullanılan XRD analizi ile araştırılmıştır. Yapı iskelelerine ait HA fazları 10° ila 80° arasındaki kırınım açıları kullanılarak tespit edilmiştir.

Biyomimetik mineralizasyon yoluyla HA çekirdeklenmesinden sonra liyofilize edilmiş hibrit yapı iskelelerinin TGA eğrileri oda sıcaklığında 700°C ’ye kadar aralıktaki azot atmosferinde elde edilmiştir. Üretilen Col/fMWCNT/CS yapı iskelesinin spesifik yüzey alanları ve gözenek boyutu dağılımları 77 K’de N₂ fiziksel adsorpsiyonu ile gerçekleştirilmiştir ve sırasıyla BET ve BJH yöntemleri ile elde edilmiştir.

Biyomineralizasyon öncesi ve sonrası tüm yapı iskelelerinin özelliklerini analiz etmek ve karşılaştırmak için FTIR spektrum analizi yapılmıştır. Yapı iskelelerinin uygun

ebatlarda kesilmesinin ardından numune bölmesine konularak 4000 ve 400 cm^{-1} dalga boyları arasında 4 cm^{-1} çözünürlüğe sahip 20 tarama ile FTIR spektrumları kaydedilmiştir.

Yapı iskelelerin mekanik özellikleri oda sıcaklığında 0,05 N yüke ayarlı tek eksenli sıkıştırma test makinesi (Instron) kullanılarak incelenmiştir. Dehidrotermal (DHT) çapraz bağlanma [116] kimyasal çapraz bağlanmaların hücreler üzerindeki toksik etkisinden dolayı [191, 192] ve ayrıca mekanik mukavemeti artırması nedeniyle [193–196] kullanılmıştır. Aynı uzunluk ve çapa sahip (2:1) çapraz bağlı silindirik yapı iskeleleri (n=5) ilk uzunluklarının %50'sine kadar 0,01 mm/sn'lik bir yer değiştirme oranında preslenmiştir. Yapı iskelelerin elastik modülleri (gerilme-gerinim grafiğinin ilk doğrusal kısmındaki eğim) ve basınç mukavemetleri (%50 deformasyon noktasında maksimum gerilme) elde edilmiştir.

Yapı iskelelerinin gözenekliliğini belirlemek için sıvı yer değiştirme tekniği kullanılmıştır. Kısaca yapı iskeleleri belirli bir hacimde (V_1) etanol içeren bir mezüre batırılmıştır. İskelelerin konulduğu mezür etanolün iskelelerin gözeneklerine itilmesi için hava kabarcığı çıkmayana kadar vakum ortamına yerleştirilmiştir. Yapı iskelesi ve etanolün toplam hacmi V_2 olarak alınmıştır. Yapı iskelesi etanolden alınmış ve kalan etanol hacmi V_3 olarak ölçülmüştür. Son olarak, her bir yapı iskelesinin gözeneklilik oranı şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$\rho = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \quad (3.8)$$

Standart sapmanın dâhil edildiği gözeneklilik ölçüm sonuçları beş numunenin ortalaması olarak sunulmuştur.

Her bir yapı iskelesinin şişme (PBS emilimi) davranışı denge-şişme deneyleri ile tespit edilmiş ve bütün deneyler üç kez tekrar edilmiştir. Dehidrotermal (DHT) çapraz bağlanmış yapı iskelelerin kuru ağırlıklarının kaydedilmesinin ardından insan dokularındaki ve vücut sıvılarındaki hücre içi ortamı taklit eden PBS'ye (50 mL, pH=7,4) daldırılmıştır. Islak ağırlıklar her 10 dakikada bir olmak üzere 2 saate kadar

kayıt edilmiştir. Her daldırma periyodunda yapı iskeleleri alınmıştır ve üzerlerindeki fazlalık su filtre kâğıdı ile hafifçe silinmiştir. Daldırma öncesi ilk ağırlık W_d olarak kaydedilmiştir ve her daldırma periyodundan sonraki ağırlık W_w olarak kaydedilmiştir. Şişme yüzdesi (E) Flory-Huggins formülünden bulunmuştur;

$$E = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100 \quad (3.9)$$

Yapı iskeleleri ayrıca iki hafta boyunca PBS çözeltilerine daldırılmıştır ve dijital olarak haftada bir fotoğraflanmıştır. Görüntüler kompozit iskelelerin bütünlüğünü incelemek için kullanılmıştır.

Ayrıca, yapı iskelelerinin hidrofiliği temas açısı yöntemi ile ölçülmüştür. Gözenekli yüzey morfolojisi temas açısını etkileyebileceğinden bu etkiyi en aza indirmek için yapı iskeleleri düzgün bir yüzeye sahip olan ince filmler halinde preslenmelerinin ardından test edilebilmiştir. Yüzeydeki damla temas açısı cihazının kamerası ile kaydedilmiştir ve kaydedilen görüntü kullanılarak yapı iskelelerinin temas açıları belirlenmiştir. Her bir iskele yüzeyi üzerinde beş bağımsız noktada yedi analiz yapılmış ve sonuçta ortaya çıkan temas açısı görüntüleri ortalama değer olarak sunulmuştur.

Yapı iskelelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT sitotoksitesite testi ile belirlenmiştir. İnsan osteosarcoma hücre dizisi MG-63 (1×10^5 /kuyu) 1,0 mL/kuyu plakalar halinde kaplanmıştır ve %5 CO₂ inkübatöründe 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Her bir numune için 0,1 g yapı iskelesi başına 1 mL kültür ortamı (%5 fetal sığır serumu takviyeli DMEM) ilave edilmiştir. İskeleler sitotoksitesite için kültür ortamı içeren kaplara yerleştirilmiş ve %5 CO₂ inkübatöründe 6-7 saat inkübe edilmiştir. Kültür ortamı ve saf kurşun ortamı sırasıyla pozitif (boş) ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her bir numuneye 5 mg/mL MTT çözeltisi ilave edilmiştir ve 4 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. MTT canlı hücrelerde metabolize edilebilen ve mor formazana indirgenebilen bir tetrazoldür. Formazan kristallerinin tamamen çözündürülmesi için 150 µL dimetil sülfoksit ilave edilmiştir

ve hücrelerin canlılığını ölçmek için optik spektrofotometre kullanılarak numunelerin optik yoğunluğu 570 nm’de ölçülmüştür.

3.2.3.5. Yeni m-5xSBF’de monofazik brushitin Ti6Al4V üzerine biyomimetik yöntemle kaplaması çalışması

Ti6Al4V yüzey morfolojileri işlemler öncesi, pürüzlendirme sonrası ve 5M NaOH çözeltisi kullanılarak 60°C’de 24 saat boyunca aşındırma (etcing) sonrası SEM ile analiz edilmiştir.

Ti6Al4V plakaları m-5xSBF ve 5xSBF içinde bırakıldıktan sonra birinci ve ikinci gün sonunda CaP çekirdeklendirilmiş Ti6Al4V yüzey morfolojileri SEM ve FESEM ile analiz edilmiştir. İkinci günün sonunda kaplamalar üzerindeki element analiz EDS ile gerçekleştirilmiştir.

İşlem görmemiş, zımparalanmış, 60°C’de 24 saat boyunca 5M NaOH çözeltisi ile muamele edilmiş ve m-5xSBF ve 5xSBF ile 2 gün boyunca kaplanmış olan Ti6Al4V yüzeylerinin ıslanabilirliği temas açısı yöntemi ile karakterize edilmiştir.

İşlem görmemiş, 60°C’de 24 saat boyunca 5M NaOH çözeltisi ile muamele edilmiş, m-5xSBF ve 5xSBF ile 1 gün boyunca çekirdeklendirilmiş ve ayrıca m-5xSBF ve 5xSBF ile 2 gün sonrasında kaplanmış Ti6Al4V yüzeylerin faz analizleri XRD ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen fazların kristal yoğunluğu, kristalin boyutu ve kristallenme oranı tez kapsamında gerçekleştirilen önceki çalışmada anlatıldığı şekilde XRD verileri kullanılarak hesaplanmıştır.

m-5xSBF ve 5xSBF’de biyomineralizasyon sonrası sırasıyla brushit ve HA kaplanmış Ti6Al4V substrat yüzeylerine ait gruplar FTIR analizi ile belirlenmiştir. m-5xSBF ve 5xSBF’de biyomineralizasyon ile Ti6Al4V yüzeyine kaplanmış brushit ve HA tozlarının partikül boyut dağılımları DLS tekniği ile analiz edilmiştir.

Ti6Al4V üzerinde elde edilen brushit ve HA fazlarının 25-900°C arasında 10°C/dk ısıtma hızındaki TGA termogramları sıcaklığa bağlı kütle değişimleri açısından aşamalara ayrılarak reaksiyonlar üzerinden analiz edilmiştir. Sentezlenen brushit ve HA tozlarının spesifik yüzey alanını belirlemek için azot ortamında gerçekleştirilmiş geleneksel BET yöntemi kullanılmıştır. Brushit ve HA kaplanmış Ti6Al4V numunelerinde yer alan grupların karakterizasyonu için Raman spektrumu analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.6. Çözelti ve kalsinasyon süresinin Sol-Jel Hidroksiapatit sentezi üzerine etkisi çalışması

950°C'de 1 saat, 2 saat ve 4 saat boyunca kalsine edilmiş su ve etanol bazlı ortamda sentezlenen HA tozlarının morfolojik incelemesi SEM analizi ile elementel dağılımı ise EDS alan analizi ile gerçekleştirilmiştir. Su bazlı HA1-HA2-HA3 ve etanol bazlı HA4-HA5-HA6 tozlarının faz incelemesi XRD analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Kristal büyüklüğü D , Debye-Scherrer denklemi (Denklem 3.3) kullanılarak [44] X_c değeri ise Denklem 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır [187]. Sentezlenen numunelerin yoğunlukları Denklem 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır [188].

3.2.3.7. Ag, Zn veya Co katkılı HA'nın biyomimetik sentezi ve fonksiyonel Ti üzerinde Ag, Zn veya Co katkılı HA/fMWCNT kompozitinin kaplanması çalışması

Kompozit kaplamaların işlemsiz ve yüzey işlem görmüş Ti substrat üzerindeki yapışma gücü, evrensel bir test makinesi (Instron) kullanılarak incelenmiştir. Kaplama yüzeylerine epoksi kaplı Al çubuklar yapılandırılmış ve 24 saat oda sıcaklığında sabitlenmiştir. Kompozit kaplamalar, Al çubuklar ile kompozit kaplama arasında kopma meydana gelinceye kadar sabit çapraz hızda (1 mm/dk) çekilerek teste tabi tutulmuştur. Ortalama gerilme dayanımı ile standart sapma Al çubuk yüzey alanı ve kırılma yükünden hesaplanarak her tip kaplama için beş numune kullanılmıştır.

Yüzey ıslanabilirliği kontrolü biyomoleküler immobilizasyon çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ti ve fMWCNT/Ag, Zn veya Co katkılı HA kaplı Ti yüzeylerinin yüzey enerjileri ve temas açıları değerlendirilmiştir. Ti ve fMWCNT/Ag, Zn veya Co katkılı HA kompozit kaplı Ti yüzeylerine damlatılan diiyodometan, formamid ve suya ait temas açıları optik tensiyometre kullanılarak analiz edilmiştir. Katı ve sıvı malzemelerin ölçülen temas açıları, Van Oss-Chaudhury-Good denklemleri olan (3.10), (3.11) ve (3.12) eşitlikleri tarafından yüzey gerilimi ile ilişkilendirilmiştir:

$$(\gamma_s^d \gamma_l^d)^{1/2} + (\gamma_s^{acid} \gamma_l^{base})^{1/2} + (\gamma_s^{base} \gamma_l^{acid})^{1/2} = 0,5\gamma_l(1 + \cos\theta_Y) \quad (3.10)$$

$$\gamma_l = \gamma_l^d + \gamma_l^{base} + \gamma_l^{acid} \quad (3.11)$$

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^{acid} + \gamma_s^{base} \quad (3.12)$$

, burada, γ_l sıvının yüzey gerilimi, γ_s katı fazların toplam yüzey enerjisi ve θ_Y temas açısıdır.

γ_s^d , γ_s^{acid} ve γ_s^{base} bilinmeyen üç değer olduğundan, denklemi çözmek için bilinen özelliklere sahip en az üç sıvı gerekmektedir. γ_s değeri saf su, formamid ve diiyodometanın yüzey kuvvetleri (γ_l^d , γ_l^{acid} ve γ_l^{base}) kullanılarak hesaplanmıştır.

Katkılı HA kompozit yüzeylerine ait temas açıları DI-H₂O, formamid (polar) ve diiyodometan (apolar) ıslatıcı sıvıları kullanılarak 5 µL sesil su damlası metodu ile incelenmiştir. Oda sıcaklığında yüzeylerin farklı kısımlarına üç damlacık bırakılmış ve damlaların her iki tarafında gözlenen temas açılarının ortalama değeri kullanılmıştır.

Katkılanmamış HA ve katkılanmış Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın morfolojileri SEM, elementel bileşimi EDS alan analizi, faz analizleri XRD ile karakterize edilmiştir. İyon katkılama sonrası HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA numunelerinin kafes parametreleri, ortalama kristal büyüklükleri ve birim hücre hacim değişiklikleri Debye-Scherrer ve Bragg yasası kullanılarak hesaplanmıştır.

FTIR ve Raman spektrumları iyon ikamelerinin HA yapısının fosfat bantları üzerindeki etkisini araştırmak için analiz edilmiştir.

Parçacık boyut analizi biyomimetik olarak sentezlenmiş numunelerin aglomerat yapısını ve boyutunu araştırmak için kullanılmıştır. Bu yöntemde yüksek doğruluğun sağlanması için toz numunelerin çözelti içerisinde dağıtılması gerektiğinden numuneler boyut dağılımı ölçümünden önce ultrasonik işleme tabi tutulmuşlardır.

Manuel presle pelet haline getirilmiş katkılanmamış HA ve Ag, Zn veya Co katkılı HA numuneleri 1xSBF içerisine bırakılarak 50 rpm ve 37°C'de çalkalamalı suyu banyosunda 1 ay boyunca bekletilmiştir. Peletler 1., 3., 5. gün ve bir ayın sonuna kadar beş gün aralıklarla çıkarılmıştır ve SBF çözeltileri analiz edilmiştir. Ag⁺, Zn²⁺ veya Co²⁺ içeren SBF pH'ı her bir zaman noktasında çevre dokuya zarar verebilecek olan asidik koşullara neden olup olmadıkları belirlenmiştir.

Katkılanmamış ve Ag, Zn veya Co katkılı HA tozlarının 800°C'ye kadar azotta ısıtılarak elde edilen termogravimetrik analizi iyon eklenmeleriyle sıcaklığa bağlı olarak kalan kütlede ne gibi etkilere neden olacağının belirlenmesi için geręekleřtirilmiřtir.

fMWCNT'nin FTIR ve temas açısı ölçümleri tez kapsamında geręekleřtirilen önceki çalışmada belirtildiği gibi geręekleřtirilmiřtir. Yine önceki tez çalışmasında anlatıldığı şekilde TiO₂ alkali işlem ile Ti yüzeyinde oluşturulmuştur ve XRD analizi ile karakterize edilmiştir. Alkali işlem sonrası Ti yüzeyi APTES ile modifiye edilmesinin ardından FTIR ve EDS analizleri APTES'in Ti yüzeyinde başarıyla oluşturulduğunun doğrulanması için geręekleřtirilmiřtir.

Hazırlanan fMWCNT/HA, fMWCNT/Ag-HA, fMWCNT/Zn-HA ve fMWCNT/Co-HA kompozitlerinin morfolojileri, Ti üzerindeki kaplamalarının mikro yapıları ve enine kesitleri SEM analizleri ile karakterize edilmiştir.

Ti yüzeylerinin işlem öncesi ve ön yüzey işlem sonrası fazları XRD ile analiz edilmiştir. Silanize edilmiş Ti substratları üzerindeki çapraz bağlanmış kompozit kaplamaların yapışma mukavemeti kaplama sonrası epoksi yapıştırılmış ve 24 saat bekletilmiş Al çubuklar kullanılarak elde edilmiştir. İyon ilavelerinin pozitif kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı üzerine etkileri MTT analizi ile elde edilmiştir.

3.2.3.8. Kanser tedavisine yönelik uyarana duyarlı akıllı ilaç dağıtım sistemi olarak NCQDs bazlı enjekte edilebilir, kendiliğinden çapraz bağlanan ve yerinde oluşan yeni çok fonksiyonlu hidrojel çalışması

Seyreltik NCQDs sulu çözeltisi hazırlanmasının ardından 15 µL hacimdeki numune TEM ızgaralarına (karbon kaplı bakır ızgara) damlatılmıştır ve numune çemberine aktarılmadan önce 4 saat boyunca vakum koşullarında kurutulmuştur. NCQDs numunelerinin görüntüleri 150 kV voltajda elde edilmiştir. ImageJ yazılımı kullanılarak parçacıkların büyüklüğü tahmin edildikten sonra, ortalama parçacık boyutu ölçümü hesaplanmıştır.

Sentezlenmiş NCQDs, HA ve oluşturulan NCQDs/Dox/HA hidrojellerinin FTIR spektrumları NCQDs ve HA'nın fonksiyonel gruplarının tanımlanması, Dox'un bir amid bağı yoluyla NCQDs'ye konjugasyonunun teyit edilmesi ve hidrojel içindeki öncüler arasında etkileşimlerin analiz edilmesi için 400–4000 cm⁻¹ aralığında 4 cm⁻¹ çözünürlükte bir FTIR spektrometresi (Spectrum-Two, PerkinElmer, ABD) kullanılarak alınmıştır. 37°C'de yerinde hidrojelasyonun ardından NCQDs/HA/Dox hidrojelleri ölçüm için liyofilize edilmiştir. FTIR spektrumu ayrıca N–H gerilme titreşimi ve primer amin gruplarının karakteristik pikini belirleyerek NCQDs'ye dayanan nanomateryal üzerine ilaç molekülünün başarılı yüklenmesini doğrulamak için kullanılmıştır.

NCQDs, HA ve dondurularak kurutulmuş hidrojellerin karakteristik kırınım zirvelerini doğrulamak için XRD analizi yapılmıştır. Numunelerin XRD paternleri 30 mA ve 40 kV'de çalıştırılan kapalı Cu K α X-ışını kaynağının ($\lambda=1,54059 \text{ \AA}$) kapalı bir tüpüyle donatılmış bir D/Max 2200 difraktometre üzerinde gerçekleştirilmiştir (adım boyutu:

0,02°/s). Kırınım verileri $2\theta=10-90^\circ$ aralığında toplanmış ve kristal fazların tanımı ICDD (Uluslararası Kırınım Veri Merkezi) kart katalogu ile yapılmıştır.

Hidrojellerin morfoloji ve gözenek yapısı analizi EDS birleştirilmiş SEM kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oksijen, azot ve karbon elementleri için aynı cihaz kullanılarak element haritalaması yapılmıştır. Görüntüleme öncesinde 96 oyuklu plakaya yerleştirilen hidrojeller -80°C 'de dondurulmuş ve 3 gün liyofilize edilmelerinin ardından dikey olarak kesilmiştir. Dondurularak kurutulmuş gözenekli hidrojeller, liyofilize numunelerin küçük bir kısmının karbon bantla kaplanmış bir numune tutucu üzerine yerleştirilmesiyle hazırlanmıştır. Ortaya çıkarılan yüzeyler SEM analizi öncesi iletken hale getirilmek için yaklaşık 90 saniye boyunca otomatik bir püskürtücü kaplayıcı kullanılarak altın kaplanmıştır. Ortalama gözenek boyutu ImageJ yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Karakterizasyonlar öncesi dondurularak kurutulmuş numuneler bir desikatör içinde saklanmıştır.

NCQDs, HA ve hidrojellerin yüzeylerinin temel bileşimini ve kimyasal durumlarını analiz etmek için monokromatik bir Al $K\alpha$ fotoelektron spektrometresi üzerinde XPS analizi gerçekleştirilmiştir. Numuneler iletken karbon bant ile koçanlara monte edilmiştir. Daha sonra, her bir numune için 0,1 eV enerji adım büyüklüğü ile 0-1200 eV aralığında üç tarama toplanmıştır. Tüm XPS spektrumları $500\times 500\ \mu\text{m}$ 'lik diyafram açıklığı kullanılarak kaydedilmiştir ve bağlanma enerjileri dâhili bir standart olarak 284,8 eV'de C 1s seviyesi kullanılarak kalibre edilmiştir.

Altın kaplı HA nanomalzemelerinin FESEM analizi (SEM analizinde açıklandığı gibi), 15 kV voltajda gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin partikül boyutu ve boyut dağılımları doğal pH'da gerçekleştirilmiş olan DLS ölçümleri ile değerlendirilmiştir. HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA hidrodinamik çapları Stokes-Einstein denklemi kullanılarak difüzyon katsayısından hesaplanmıştır. Bu amaçla 0,1 mg/1 mL oranında DI-H₂O içinde dağıtılmış numuneler aglomerasyonu azaltmak için 2 saat boyunca karıştırılmıştır ve daha sonra 30 dakika süreyle sonike edilmesinin ardından partikül boyutu ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan numunelerin zeta (ζ) potansiyeli oda sıcaklığında ve $\theta=12,8^\circ$ 'de ölçülmüştür. İlgili verilerle birlikte tüm DLS ve ζ potansiyel eğrileri analiz cihazıyla birlikte verilen yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. Tek kullanımlık berrak zeta hücreleri kullanılmış ve her analiz için üç ölçüm turu gerçekleştirilmiştir.

Tarama aralığı 0,5 nm çözünürlükle 200-800 nm'ye ayarlanmış UV-Vis spektrofotometre, sentezlenen NCQDs'nin absorbans davranışını bulmak için kullanılmıştır. Verileri kaydetmek ve analiz etmek için spektrofotometre ile donatılmış yazılım kullanılmıştır. Dox yükleme içeriği ayrıca UV-Vis spektrofotometrisi kullanılarak ölçülmüştür.

Hava-su arayüzlerindeki NCQDs dinamik arayüzey gerilimi (DST) tansiyometre kullanılarak asılı damla tekniği ile ölçülmüştür. Bilinen bir konsantrasyonda NCQDs dispersiyonları içeren sulu bir damla havada süspanse edilmiştir. Paslanmaz çelik bir iğneye takılan Hamilton şırıngası kullanılarak 10 μ L'lik bir damla oluşturulmuştur ve her ölçüm üç kez gerçekleştirilmiştir. Arayüzey gerilimi analiz yazılım paketi kullanılarak Young-Laplace denkleminin uyan damlacık profilinden çıkarılmıştır. Ultra hızlı kamera ile 10000 saniye boyunca tutulan sabit damla hacmi yakalanmıştır ve arayüzey gerilimi zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilmiştir. Bu yöntemle arayüzdeki jellerin adsorpsiyonu gerçek zamanlı olarak değerlendirilmiştir.

Farklı oranlarda hazırlanan NCQDs/HA/Dox hidrojellerinin jelleşme süreleri ters çevirme yaklaşımı kullanılarak belirlenmiştir. Eşit hacimde hazırlanan sulu NCQDs/HA/Dox çözeltilerini içeren şişeler termostatik olarak kontrol edilen bir su banyosunda 37°C'de inkübe edilmiştir ve akışkanlık şişelerin ters çevrilmesiyle her 5 dakikada bir olacak şekilde incelenmiştir. Ters çevirme işlemleri sonrası 30 saniye içinde akmayan bir jel oluşturmak için gereken süre jelleşme süresi olarak kaydedilmiş ve her veri noktası ölçümü üç kez tekrarlanarak ölçümlerin ortalaması hesaplanmıştır. Dox ve HA içeren farklı NCQDs sulu çözeltilerinin jelleşme süresi karşılaştırılmıştır.

Enjekte edilebilirlik çalışmalarında manuel enjeksiyonun kabul edilebilir olduğunu ve manuel standart sapmaların makineden daha düşük olduğunu bildirmiştir [197].

Hidrojellerin enjekte edilebilirliği 2 mm'lik bir açıklığa sahip 2,5 mL hacmindeki ticari tek kullanımlık şırıngalar kullanılarak manuel ekstrüzyonu ile ölçülmüştür. Dox ve HA içeren NCQDs sulu çözeltilerinin 10 dakika boyunca karıştırılmasının ardından su banyosunda 37°C'de jel halini aldığı anda şırınganın içine ilave edilmiş, ardından sıkıştırma başlatılmış ve homojen hale getirilmiş olan hidrojel karışımları şırıngadan ekstrüde edilmiştir. Hidrojellerin enjekte edilebilirliği şırıngadan ekstrüde edilen karışımın kütlesinin şırıngadaki karışımın orijinal kütlesine bölünmesiyle belirlenmiş ve her ölçüm üç kez tekrarlanmıştır.

NCQDs bazlı hibrit tozların ve HA tozlarının antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi (DDM) kullanılarak *S. aureus*'a karşı gerçekleştirilmiştir. DDM ile NCQDs bazlı hidrojellerin inhibe edici etkisini incelemek için hidrojel dondurularak kurutulmuştur ve agat havanda toz haline getirilmiştir. Bakteri kültürleri (mL başına 1×10^3 koloni oluşturan birim, CFU) kütle-hacim oranı 0,2 g/mL şeklinde steril koşullar altında katılaştıran agar plakaları üzerine yayılmıştır. Toz haline getirilmiş numuneler ayrı ayrı 37°C'de 24 saat inkübasyon için agar petri kapları üzerindeki bakteri büyüme merkezine yerleştirilmiştir. Aynı miktardaki numunelerin etrafında olan inhibisyon bölgesi (canlı mikrobiyal hücrelerin yokluğu) dikkate alınarak antimikrobiyal aktivite değerlendirilmiştir ve analiz için optik görüntüler bir dijital kamera ile kaydedilmiştir. Antimikrobiyal aktivite toz haline getirilmiş hidrojel ile temas eden agar yüzeyinde bakteri üremesinin önlenme kabiliyeti ile niteliksel olarak değerlendirilmiştir. Hazırlanan toz haline getirilmiş hibrit numunelerin uzun süreli antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığını araştırmak için başka bir antimikrobiyal deney gerçekleştirilmiştir. Ayrıntılı olarak, agar plakaları her 2 günde bir değiştirilmiş ve inhibisyon bölgelerinin çapı kaybolana kadar ölçülmüştür. Sentezlenen numunelerin antibakteriyel etkisi olarak kaydedilen inhibisyon bölgesi her bir zaman aralığında milimetre cinsinden ölçülmüştür.

İnsan meme kanseri hücre dizisi (MCF-7) ve fare fibroblast hücreleri (L929) %10 fetal sığır serumu (FBS), $1,0 \times 10^5$ UL⁻¹ penisilin ve 100 mg/L streptomisin çözeltisi ile desteklenen DMEM ortamında 50 mL plastik kültür şişelerinde büyütülmüştür.

Hücreler rutin olarak %5 CO₂ ve %95 hava sağlayan bir CO₂ inkübatöründe 37°C'de tutulmuştur ve kullanımdan önce her beş günde bir alt kültürlenmiştir.

Sitotoksisite ve ilaç verme çalışmaları NCQDs bazlı hidrojellerin antikanser aktivitesini yorumlamak için kullanılmıştır. Numunelerin in-vitro sitotoksitesini MTT deneyi ile değerlendirilmiştir. L929 hücreleri farklı hidrojel konsantrasyonlarının toksisitesini pH 7,4'te ölçmek için kullanılırken MCF-7 hücreleri, her iki pH (pH 6,5 ve 7,4) NCQDs/Dox/HA'nın pH'a bağımlı ilaç iletimini araştırmak için kullanılmıştır. Hücreler ilk olarak oyuk başına 5×10³ hücre yoğunluğunda 24 oyuklu doku kültürü plakalarına ekilmiştir. İnkübasyon uygun hücre bağlanması için gece boyunca yapılmıştır ve daha sonra kültür ortamı 2 gün boyunca taze ortam (pH 6,5 veya 7,4) ile değiştirilmiştir. Hücre kültür ortamının pH değeri normal bir fizyolojik ortamı taklit etmek için 7,4'e ayarlanmış ve tümör dokularındaki zayıf asidik ortamı taklit etmek için asetik asit tamponu kullanılarak 6,5'e ayarlanmıştır. NCQDs, NCQDs/HA ve NCQDs/Dox/HA hidrojellerinin oyuklara ayrı ayrı ilave edilmesinin ardından her bir oyuga 100 µL 5mg/mL MTT reaktif sarı çözeltisi içeren taze ortam dökülmüştür. Hidrojeller ve ortam çıkarılmadan önce hücre kültür plakaları 4 saat süreyle inkübe edilmesinin ardından reaksiyon sona erdirilmiştir ve mor formazan kristallerini çözmek için 1 mL DMSO ilave edilmiştir. Kantitatif hücre canlılığı hesaplamaları için her kuyucuğun 570 nm'sindeki absorbansı bir mikrolaka okuyucu kullanılarak alınmıştır. Muamele edilmemiş kontrol numunesi (%100 canlılık) canlılık hesaplamalarında nispi değer olarak alınmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmıştır ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Hücre canlılığı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre canlılığı}(\%) = \frac{(A_{570-690})_{\text{deney hücreleri}}}{(A_{570-690})_{\text{kontrol hücreleri}}} \times 100 \quad (3.13)$$

, burada A absorbanstır.

Normal ve kanser hücre dizilerinde NCQDs uygulanması ile hücrelerin çok renkli görüntülenmesi araştırılmıştır. Her hücre, gece boyunca 0,3×10⁶ yoğunlukta 12 oyuklu bir plakada büyütülmüştür. Ardından oyuklar 0,4 mg/mL sterilize edilmiş NCQDs

(MTT'den sonra elde edilen IC50 konsantrasyonu) taze ortamı ile değiştirilmiştir ve 37°C'de %5 CO₂ altında 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. pH 7 tamponu ile iki kez yıkanma sonrası NCQDs uygulanmış ortamlar ilgili LED filtrelerde ters flüoresan mikroskop kullanılarak biyogörüntülenmiştir. LED (593nm emisyon), RFP (530 nm excitation ve 525 nm emisyon), GFP (470 nm excitation), DAPI (447 nm emisyon ve 360 nm excitation) filtreleri kullanılarak görüntüler alınmıştır.

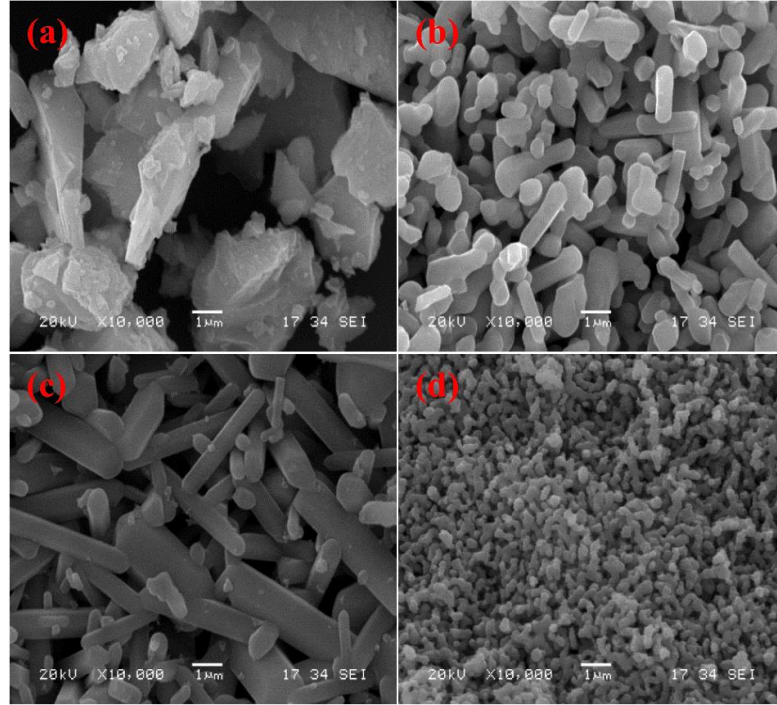
BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Farklı Kalsiyum Kaynakları Kullanılarak Hidroksiapatitin Mikrodalga Destekli Biyomimetik Sentezi Çalışması

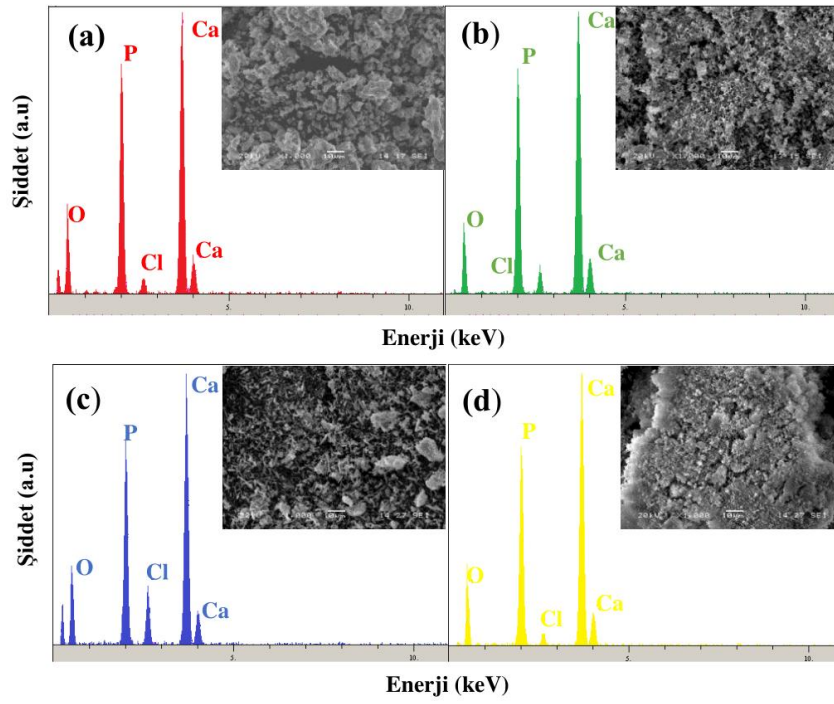
Sentezlenmiş ve ısıtılmış HA tozlarının SEM görüntüleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Numune-1 partikül büyüklüğü açısından daha düşük homojenliğe sahiptir ve Numune-2 ve 3'ün homojen parçacık boyutu dağılımı ve hegzagonal yapıya sahip oldukları görülmektedirken Numune-3'e kıyasla Numune-2 daha küçük parçacık boyutuna sahiptir. Numune-4 ise diğer tüm numuneler ile kıyaslandığında daha küçük ve daha dar olan küre benzeri morfolojiye sahiptir. Kristal parçacık boyutlarının ve şekillerinin biyolojik reaksiyonlarda kritik rol oynadığı bilinmektedir [198–202]. Örneğin, CaP parçacıklarının boyutu ve şekli hücrel aktivite ile apoptozu, osteoblast çoğalmasını ve osteojenik gen ekspresyonunu etkilemektedir [17, 200, 202–204]. Ayrıca, küreselin aksine rod-like HA nanopartiküllerine hücreler kültüre edildiğinde hücre göçü ve osteoblast çoğalmasını azalmıştır. Ancak küresel nanopartiküllerin daha yüksek metabolik enzim salınımlarına neden olması küresellerin rod-like ile kıyaslandığında osteoblastlar için potansiyel olarak daha riskli olabileceğini önermektedir [203]. Osteoblast çoğalmasından Numune-4'ü talep etmek mümkündür fakat daha uzun osteoblast ömrü için Numune-2 ve 3 umut verici seçenekler olarak görünmektedir.

EDS alan analizi sonuçları Şekil 4.2.'de gösterilmiş ve elementlerin atomca (at.) ve ağırlıkça (ağ.) yüze oranları Tablo 4.1.'de verilmiştir. Tablo 4.1.'de görülebileceği gibi, Numune-2 ve 4'ün Ca/P oranlarının 1,5'e yani insan kemiğinin Ca/P oranına en yakın olduğu bulunmuştur. Bu nedenle Numune-2 ve 4'ün hızlı osteoblast çoğalmasından dolayı uygun biyomalzemeler olabileceğini söylemek mümkündür.

EDS analizi ile HA kristal yapısına katılmış olan Cl elementi tespit edilmiştir ve özellikle Numune-3'te yüksek miktarda olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. Numune-1 (a), 2 (b), 3 (c) ve 4 (d) etiketli numunelerin SEM görüntüleri.

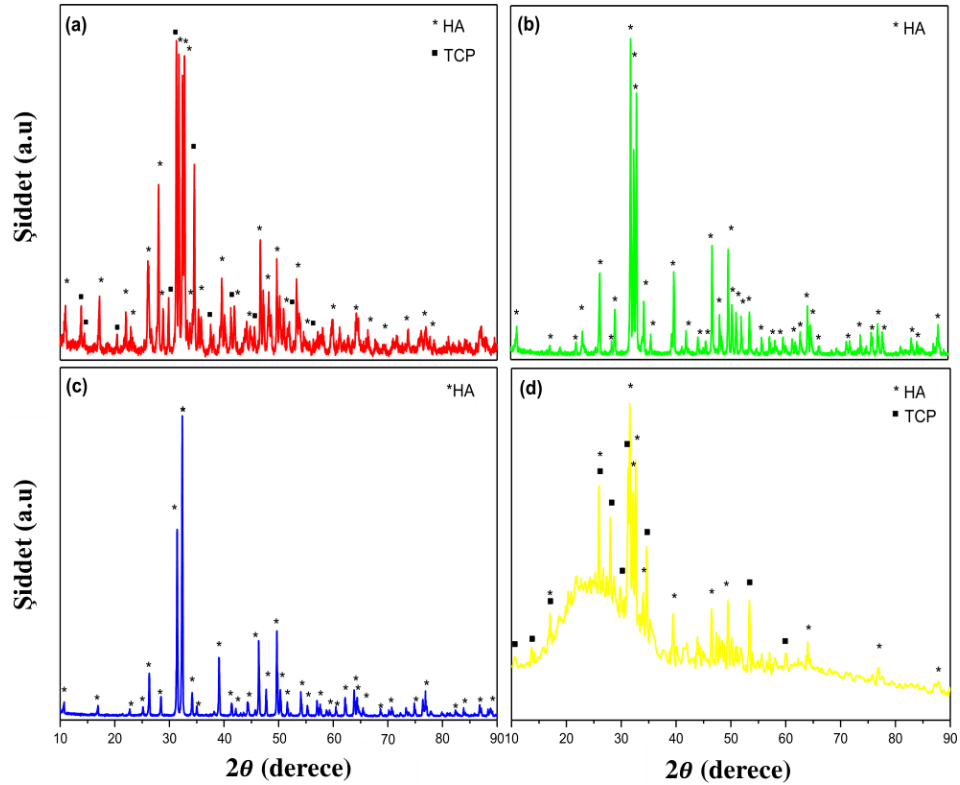


Şekil 4.2. Numune-1 (a), 2 (b) 3 (c) ve 4 (d) numunelerinin EDS analizi.

Tablo 4.1. Numune-1 (a), 2 (b) 3 (c) ve 4 (d) numunelerinin atomik ve ağırlıkça EDS analizleri ve Ca/P atomik oranları.

Numune	O		P		Cl		Ca		Ca/P Atomik oran
	Ağ.	At.	Ağ.	At.	Ağ.	At.	Ağ.	At.	
1	41,527	61,559	21,241	16,264	1,858	1,243	35,374	20,933	1,2871
2	39,431	59,621	20,378	15,916	2,574	1,756	37,617	22,706	1,4266
3	43,926	63,893	18,364	13,798	5,447	3,576	32,262	18,733	1,3577
4	41,158	61,329	20,340	15,655	1,439	0,968	37,064	22,048	1,4084

XRD modelleri Numune-1'in bifazik HA ve TCP fazlarına sahip olduğunu Numune-2'nin ise tek fazlı HA'dan oluştuğunu göstermiştir. Numune-3'te klor katkılı HA belirlenirken, Numune-4'te tespit edilen fazlar klor katkılı HA ve TCP'dir (Şekil 4.3. ve Tablo 4.2.). Daha etkin bir kemik yenilenme yeteneği ve kontrol edilebilir bozulma oranı nedeniyle HA ve TCP'den oluşan bifazik TCP/HA tıpta kemik grefti olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [24–26, 28].



Şekil 4.3. Biyomimetik yöntemle sentezlenen numunelerin XRD analizleri.

Tablo 4.2. XRD paternlerinden elde edilen latis parametreleri ve kristal boyutlar.

Numune	Uzay Grubu	Latis Sabitleri (Å)			Kimyasal Formül	FWHM (°)	2θ° (I ₀₀₂)	Z	Yoğunluk (g/cm ³)	Birim Hücre Hacmi (Å ³)	Ortalama Kristal Boyutu, D (nm)	Kristalinite, X _c
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>								
1	P2 ₁ /b (14)	9,421	18,843	6,881	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	0,190	31,740	4	3,153	1058,0	45,42	2,01
2	P6 ₃ /m (176)	9,417	9,417	6,874	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	0,185	31,940	2	3,159	527,9	46,67	2,18
3	P6 ₃ /m (176)	9,541	9,541	6,838	Ca _{9,54} P _{5,98} O _{23,58} Cl _{1,60} (OH) _{2,74}	0,180	31,420	1	3,227	539,1	47,91	2,37
4	P6 ₃ /m (176)	9,488	9,488	6,855	Ca _{4,905} (PO ₄) _{3,014} Cl _{0,595} (OH) _{1,67}	0,292	31,560	2	3,315	534,4	29,54	0,53

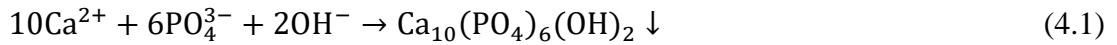
FWHM: Her bir dört numunenin en yüksek piklerinin maksimum şiddetlerinin yarı genişliği.

Z: Birim hücredeki molekül formül sayısı.

Bu bilgiler ışığında Numune-1 ve 4'ün biyomedikal uygulamalar için uygun biyomalzemeler olabileceği düşünülmektedir. Saf kloroapatitteki hidroksil gruplarının klorür iyonları ile yer değiştirilmesi alkali tuzların hızlı çözünürlüğüne yol açarak ortam asitliğini artıracığından dolayı iyi bir biyomalzeme değildir. Biyolojik kemik içindeki klor oranı %0,13'e kadar çıkabilirken saf kloroapatitte ise bu oran %6,8'dir ve saf kloroapatite kıyasla klor katkılı HA (Cl-HA) biyomedikal uygulamalar için uygundur [205]. Apatit kafesindeki klor stokiometrik HA'ya göre 2θ açılarının daha düşük değerlere doğru kaymasıyla açıklanabilir [206]. Bu kayma EDS analizinde yüksek Cl miktarı tespit edilen Numune-3 için belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. Bu nedenle biyomedikal alanında kullanımıyla ilgili daha fazla araştırma için Numune-4'ün yanı sıra Numune-1'de uygun biyomalzeme olarak düşünülebilir.

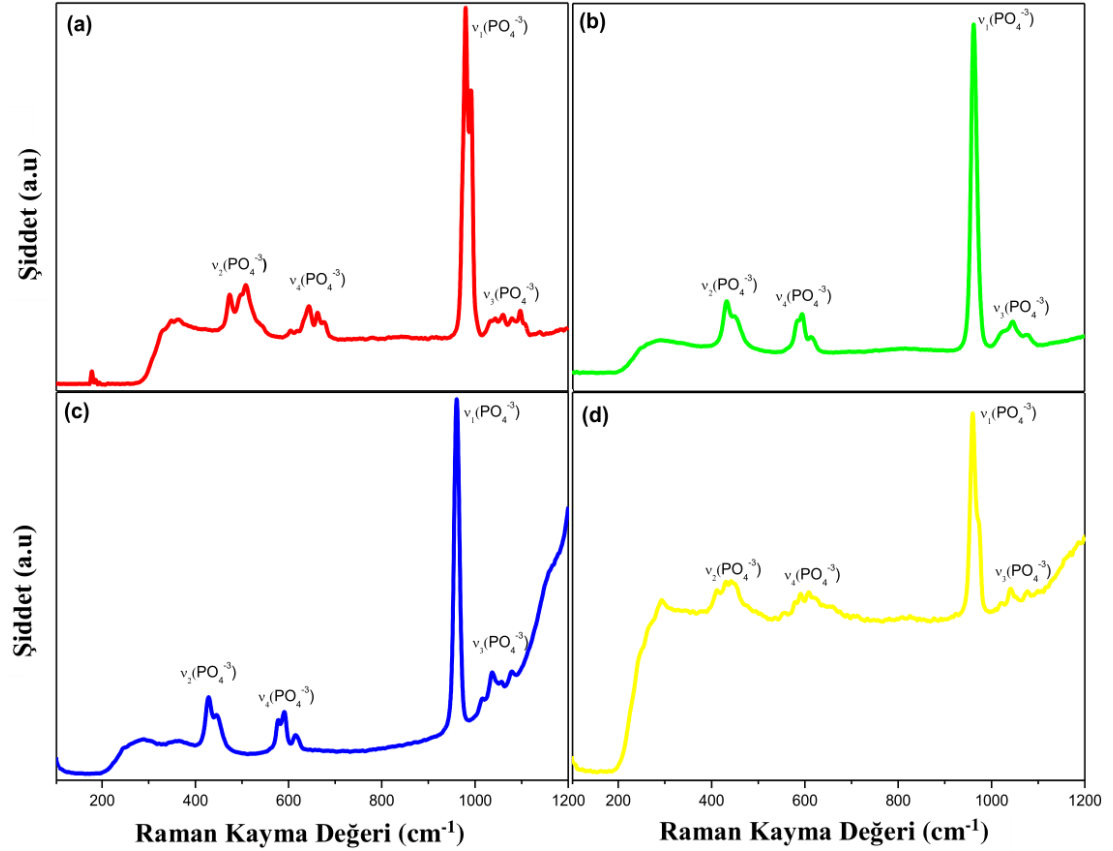
X_c değerinin Numune-4 için azalırken Numune-1, 2 ve 3'te arttığı görülmüştür. Numune-4'te en düşük kristalin boyutu gözlenmesine rağmen kristal büyüklüğünün kalsiyum kaynakları ile belirgin bir şekilde etkilenmediği anlaşılmış ve numunelerin kristal yoğunlukları 3,15 ile 3,31 g/m³ arasında bulunmuştur. Yüksek kristaliniteadaki HA numunelerinin düşük biyobozunma oranına sahip olduğu bilinmektedir [207, 208]. Bu nedenle en düşük kristalinite ve kristal boyutuna sahip Numune-4'ün biyobozunma oranı ve dolayısıyla biyoaktivitesi açısından daha dikkat çekici olduğu kabul edilebilir.

Kendiliğinden oluşan HA ve TCP kristalleri üzerinde Ca^{2+} , PO_4^{3-} ve OH^- 'in elektrostatik etkileşimler ile çökmesi nedeniyle kristal oluşumu ve büyümesi gerçekleşmektedir. HA ve TCP ana oluşum reaksiyonları Denklem (4.1) ve (4.2)'de verilmiştir [209]:



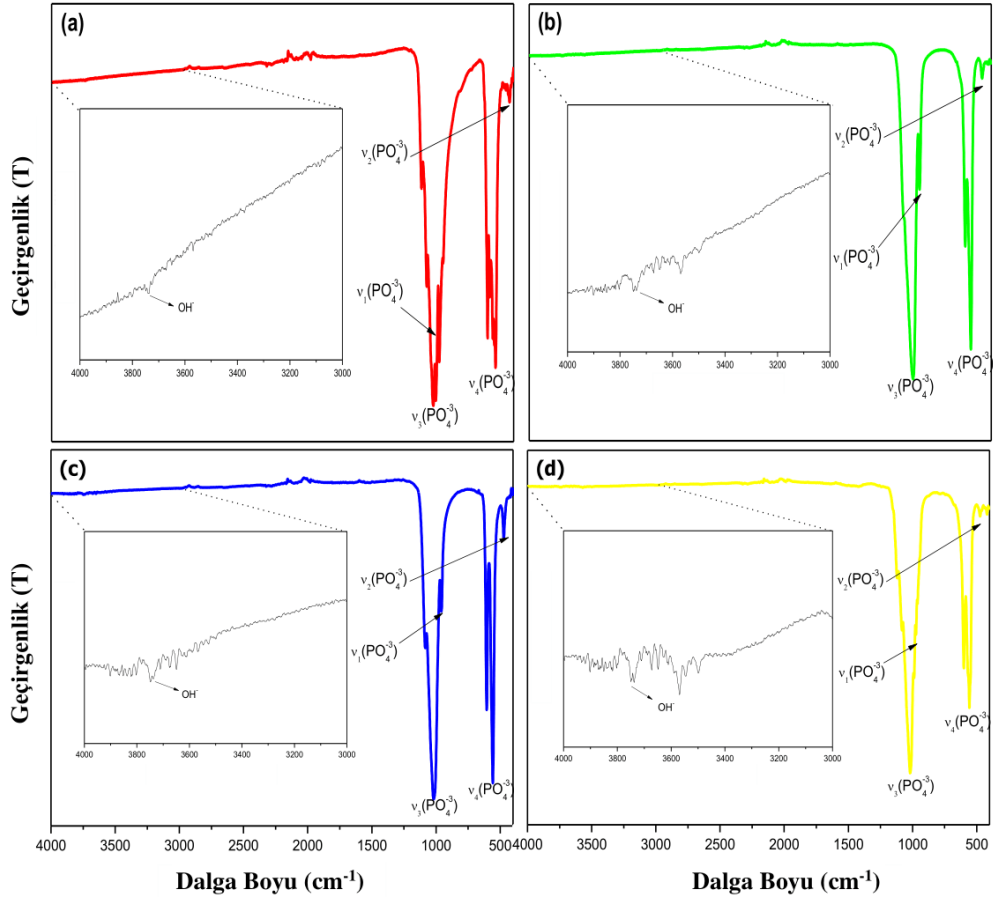
Şekil 4.4.'de verilen Raman analizi sonucunda HA yapısında bulunan gruplara ait tüm titreşim pikleri görülmüştür. Yaklaşık 960 cm⁻¹ de görülen PO_4^{3-} 'e ait simetrik gerilme piki (ν_1) karakteristik HA pikidir. Asimetrik gerilme titreşimleri (ν_2) 1050 cm⁻¹,

düzlem dışı bükülme (v_3) 450 cm^{-1} ve düzlem içi bükülme (v_4) 600 cm^{-1} civarlarında görülmüş ve literatürle uyumludur [93, 210–212]. Numune-4'te diğer numunelere kıyasla belirgin bir şekilde arka plan yükselmesi, pik genişlemesi ve pik sivriliklerinde azalma görülmektedir. Bu verilen XRD analizi ile örtüşmekte ve Numune-4'ün daha düşük kristaliniteye sahip olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.4. Numune-1 (a), 2 (b), 3 (c) ve 4 (d)'ün Raman spektrumları.

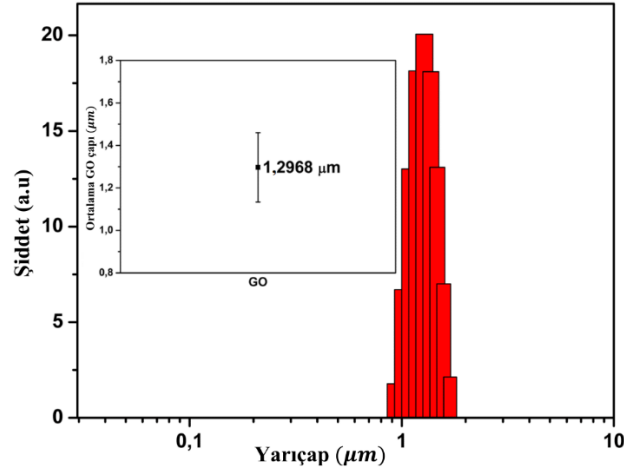
Sentezlenen tozların FTIR spektrumları Şekil 4.5.'te verilmiştir. Her bir numuneye ait PO_4^{3-} bantları dört numune için de şu şekildedir: 470 cm^{-1} 'deki v_2 (OPO) bükülmesine, 565 ve 607 cm^{-1} aralığındaki çift v_4 (OPO) bükülmesine, 957 cm^{-1} 'deki v_1 (PO) simetrik gerilmesine ve $1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki çift v_3 (PO) antisimetrik gerilme moduna karşılık gelmektedir. Bu bantlar apatit kafesindeki PO_4^{3-} 'e ait karakteristik yapıları göstermektedir [213, 214]. Dört spektrumunun her birinde 3738 cm^{-1} 'de zayıf pik HA kafesteki OH^- iyonların gerilme titreşimiyle ilgilidir [215] ve FTIR sonuçlarının XRD ve Raman sonuçlarını desteklediği görülmüştür.



Şekil 4.5. Numune-1 (a), 2 (b), 3 (c) ve 4 (d)'ün FTIR spektrumları.

4.2. GO İndirgenmesinin HA ve TCP Oluşumuna Olan Etkisi Çalışması

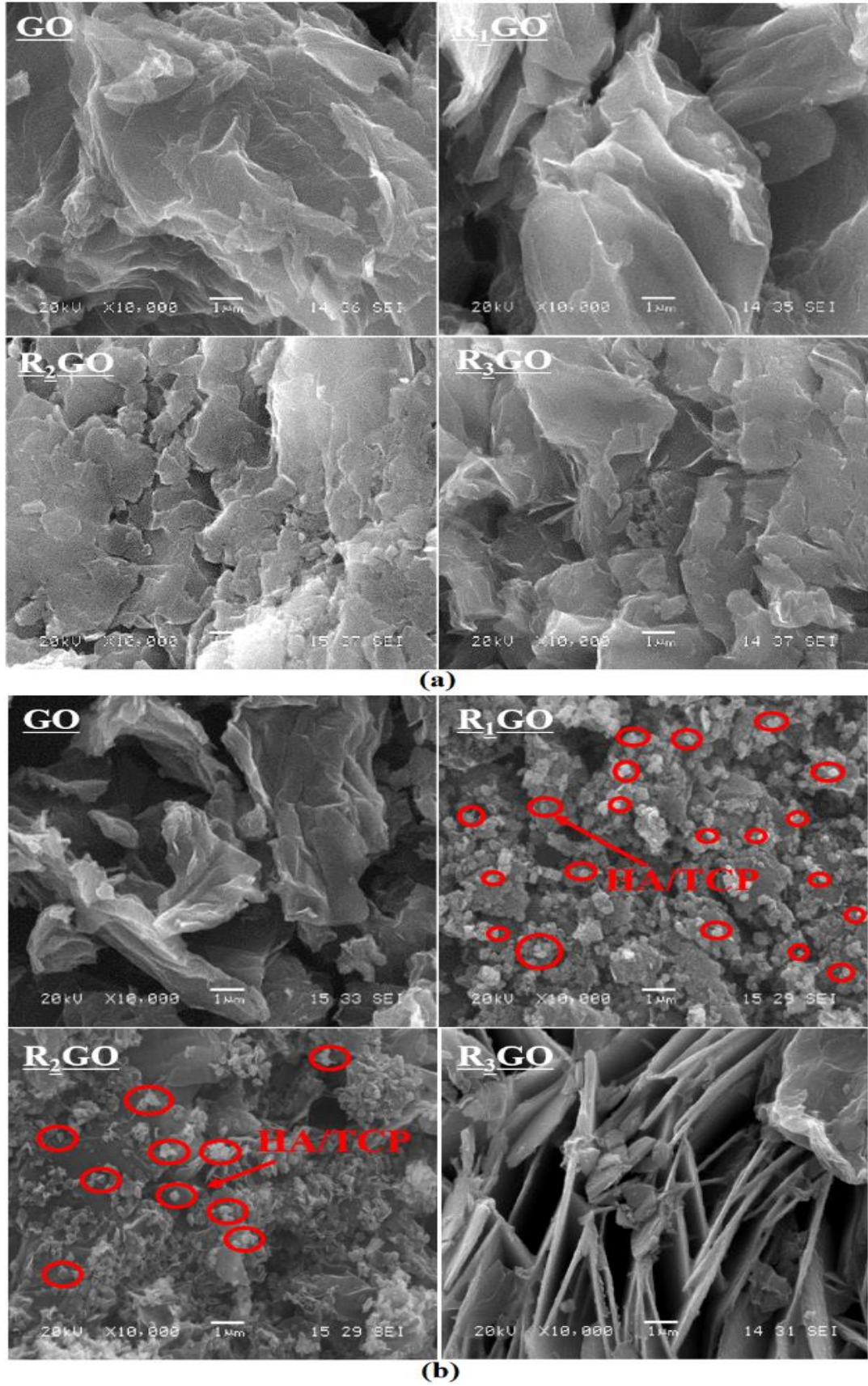
GO geniş spesifik yüzey alanı (813,2 m²/g) nedeniyle biyomimetik mineralizasyon için nano ölçekli takviye malzemesi olarak dikkat çekmektedir. BET yöntemi kullanılarak elde edilen bu yüzey alanı teorik değerinin (2620 m²/g) [216] altında bulunmuştur. Sulu GO dispersiyonunun partikül boyutu dağılımı DLS analizi ile belirlenmeden önce GO'yu dağıtmak için bir mikro uçla 5 dakika boyunca ultrasonizasyon gerçekleştirilmiştir. DLS birkaç nanometreden birkaç mikrona kadar bir boyut aralığında parçacık boyutunu ölçmek için uygulanan bir tekniktir. DLS GO gibi düzlemsel tabakalar yerine küresel parçacıklar için daha uygun olmasına rağmen, GO'nun tek tip boyutta dispersiyonunun üretilip üretilmediğini göstermesi için kullanılmıştır. Şekil 4.6.'da gösterildiği gibi dar bir aralıkta dağılmış olarak başarılı bir şekilde elde edilen GO'nun ortalama boyutu 1,2968 µm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6. Boyut dağılım diyagramı ve GO'nun ortalama boyutu.

Şekil 4.7.'deki SEM görüntüleri biyomineralizasyon öncesi (Şekil 4.7.a) ve sonrası (Şekil 4.7.b) GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun morfolojilerini göstermektedir. 5xSBF'ye daldırılmadan önce iki boyutlu membran yapısı sonike edilerek termodinamik olarak stabil hale geldiğinden dolayı hem GO hem de RGO'lar rastgele kümelenmiş ince buruşuk tabakalar, kırışıklıklar ve kıvrıklıklar şeklinde gözlenmiştir [216]. Biyomineralizasyon öncesi GO tabakası RGO tabakalarına kıyasla daha az kırışmış tabaka benzeri bir yapı ve azaltılmış yanal boyut göstermiştir. GO indirgenmesi ile fonksiyonel gruplar içeren oksijenin azalması sonucu atomik yeniden düzenlenmeye bağlı olarak azalmış pürüzlülük ve genişletilmiş tabakaların elde edilmesine neden olmuştur [217]. R1GO ve R2GO yüzeyinde 5xSBF'ye 3 hafta boyunca daldırılmasının ardından (Şekil 4.7.b) küresel nHA/TCP gözlemlenmiş ve HA/TCP'nin bifazik yapısı XRD analizi ile doğrulanmıştır.

HA/TCP'nin biyomineralizasyonla en yoğun olduğu numune yüzeylerinin R1GO ve R2GO'ya ait olduğu XRD paternleri ve Şekil 4.7.b'deki SEM görüntüleri ile açıkça desteklenmektedir. Katmanlı agregat halinde gözlemlenen R3GO tabakalarına ait morfolojinin sebeplerinin RGO tabakaları arasındaki yüksek π - π etkileşimleri ve yüzeye çekilen Ca^{2+} ile PO_4^{3-} iyonlarının HA/TCP çekirdeklenmesine neden olmayacak kadar düşük konsantrasyonda olduğu düşünülmektedir. XRD ve TGA analizlerinden görülebileceği gibi oldukça az HA/TCP içeriğine sahip olmasından dolayı GO'ya ait morfolojinin biyomineralizasyondan önce ve sonra aynı kaldığı düşünülmüştür.



Şekil 4.7. GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin (a) biyomineralizasyon öncesi ve (b) sonrası SEM görüntüleri.

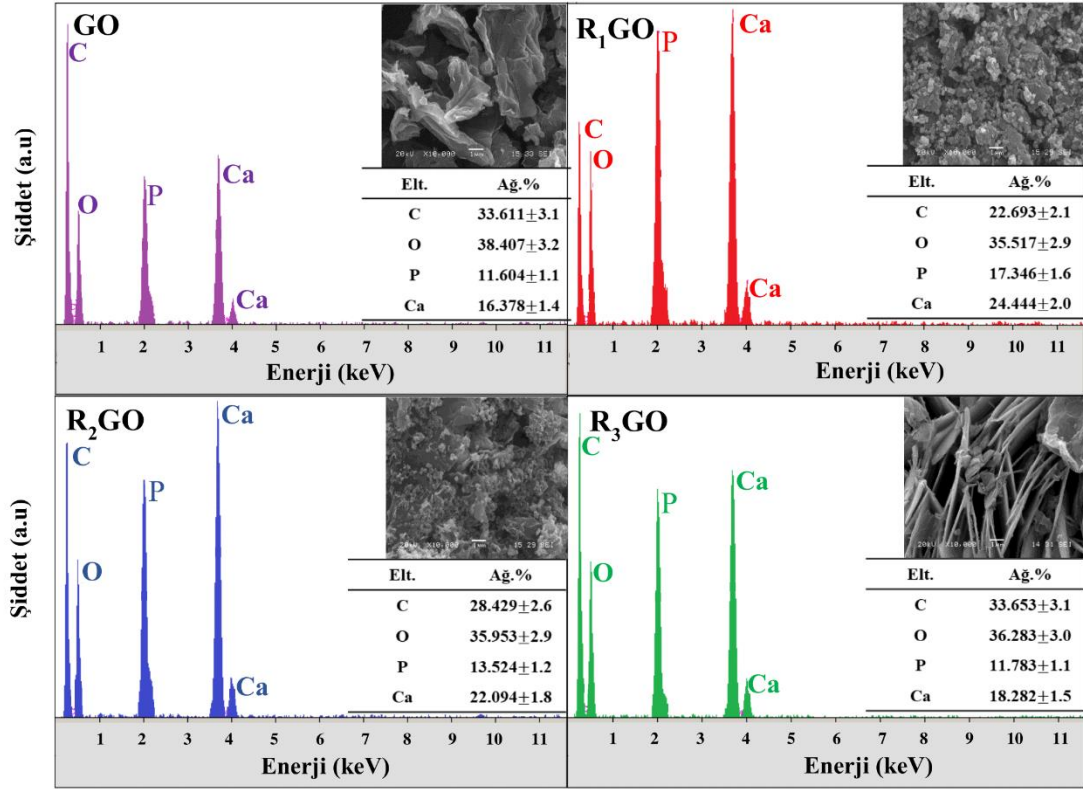
EDS alan analizi sonuçları Şekil 4.8.'de gösterilmiş ve elementlerin ağırlıkça yüzde oranları Şekil 4.8.'deki tablolar ile verilmiştir. Ca ve P miktarı (ağırlıkça %) büyükten küçüğe doğru şu şekilde değişmiştir: R1GO>R2GO>R3GO>GO.

Biyomineralizasyon işleminden önce GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin nötr pH'ta elde edilen zeta potansiyel analizleri Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. Kolloidal parçacıklar büyük bir negatif veya pozitif zeta potansiyeline sahip olduklarında birbirlerini itmekte ve topaklanma eğilimi göstermemektedirler. Aksine parçacıklar düşük zeta potansiyeline sahip olduklarında parçacıklar arasında itici güç azdır ve topaklanma (aglomerasyon) eğilimi göstermektedirler. Kolloidler 30 mV'den daha pozitif veya -30 mV'den daha negatif zeta potansiyel aralığında stabil olarak kabul edilmektedirler [218, 219].

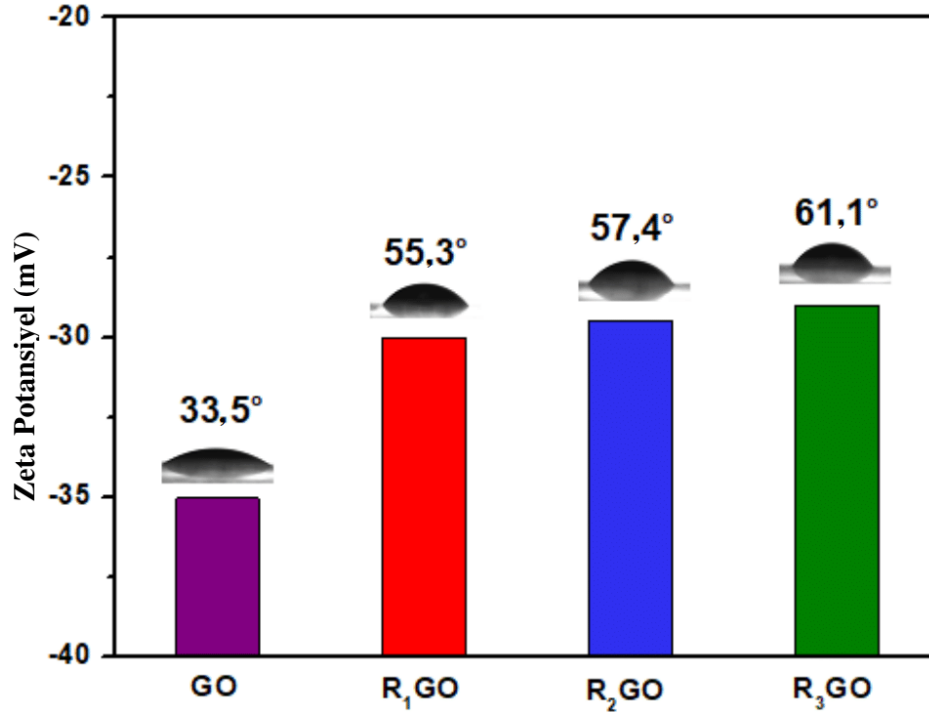
Negatif zeta potansiyeli GO yüzeyindeki oksijen içeren fonksiyonel gruplara bağlıdır. Şekil 4.9.'da gösterilen zeta potansiyel ölçümleri sonucu tüm yüzeyler genel olarak negatif yüklüdür ve GO, R1GO, R2GO, R3GO için sırasıyla -35,05, -30,01, -29,5, -29,01 ve -28,9 olarak bulunmuştur. Zeta potansiyelinin mutlak değeri indirgenmenin artmasıyla oksijen içeren fonksiyonel grupların azalması nedeniyle GO'dan R3GO'ya doğru gidildikçe azalmaktadır.

Şekil 4.9.'da GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerine ait zeta potansiyelleri ile birlikte verilen biyomineralizasyon öncesi temas açısı ölçümleri DI-H₂O (4 µL) kullanılarak ve sesil damla yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun temas açıları sırasıyla 33,5°, 55,3°, 57,4° ve 61,1° olarak bulunmuştur ve her bir numune için üç ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Hidrofilik oksijen içeren fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle en düşük temas açısına GO numunesi sahipken yüzeydeki oksijen grupları indirgenmesi ve yüzeyin hidrofobiklik kazanmasından dolayı en yüksek temas açısına ise R3GO numunesi sahiptir.



Şekil 4.8. Biyomineralizasyon sonrası GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun EDS alan analizi.



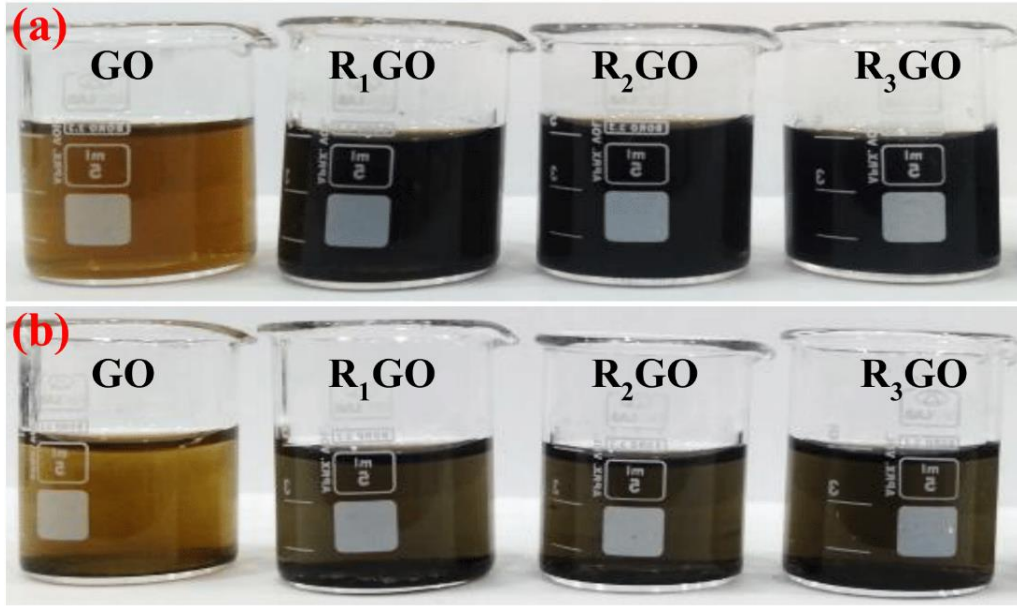
Şekil 4.9. Biyomineralizasyondan önce nötr pH'da GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin zeta potansiyelleri ve temas açıları.

Şekil 4.10. biyomineralizasyondan önce hazırlanan GO, R1GO, R2GO ve R3GO çözeltilerini (0,5 mg/mL) göstermektedir. İndirgenmenin görünür bir özelliği olarak GO süspansiyonunun rengi tabakaların yüzey polarlığının azalmasının neden olduğu hidrofobiklikteki artışın sonucu [220] indirgeme sırasında sarı-kahverengiden siyaha değişmiştir ve bu değişim RGO'ların oluşumunu belirtmektedir. Çözelti ortamına iyi dağılmış GO fotoğraflarda gösterildiği gibi bekleme sonrası askıda kalmayı hala devam ettirmektedir. GO kolloidleri yüzeydeki hidrofilik gruplar sayesinde stabilize edilebilir ve polar fonksiyonların azalması hidrofobikliğin artmasına neden olur [221]. Zeta sonuçlarıyla uyumlu olarak iki günün ardından GO'nun stabilitesinin RGO'lardan daha kararlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.10.b).

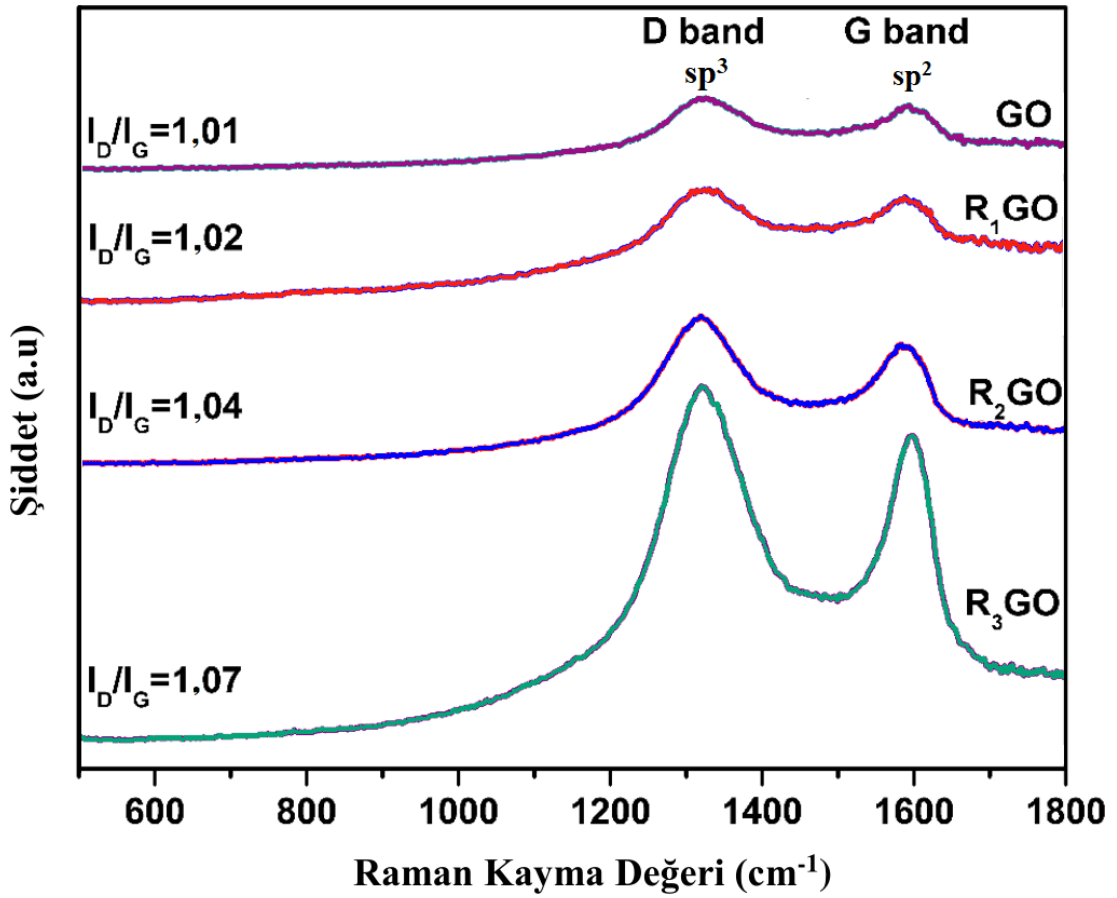
Raman spektroskopisi grafenlerin düzenli ve düzensiz kristal yapılarını ayırt etmek için karbonlu malzemeleri karakterize etmede kullanılır. Biyomineralizasyon öncesi GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun Raman spektrumları Şekil 4.11.'de gösterilmektedir. Genel olarak grafenin Raman spektrumu iki ana özellik ile karakterize edilir: her iki halka ve zincirde sp^2 karbonunun E_{1g} fononunun birinci dereceden saçılmasından kaynaklanan G bandı, A_{1g} simetrisinin k -nokta fotonlarının solunum modundan ve sp^3 karbon atomlarının gerilme titreşiminden kaynaklanan D bandı [222, 223].

Numunelerin Raman spektrumunda sırasıyla 1322 ve 1596 cm^{-1} 'de D ve G bantları gözlemlenmiştir. D-bant şiddetinin (I_D) G-bant şiddetine (I_G) oranı grafen bozukluğunu temsil etmektedir. I_D/I_G değerleri sırasıyla GO, R1GO, R2GO ve R3GO için 1,01, 1,02, 1,04 ve 1,07 olarak belirlenmiştir.

GO'dan R3GO'ya olan bu kademeli düşüş bize şunları belirtmektedir: GO tabakalarındaki oksijen fonksiyonel gruplarının çıkarılabildiği; konjuge grafen ağının (sp^2 karbon) farklı miktarlarda indirgeyici ile yeniden kurulabileceği; oksijen atomlarının uzaklaştırılması ve ardından çift bağların oluşması ile indirgeme işleminin bir sonucu olarak GO'daki kusur yoğunluklarının azaltılabileceği [224]. Ayrıca RGO'nun indirgenmemiş GO'ya kıyasla termal stabilitesindeki artışları teyit etmek için TGA analizi gerçekleştirilmiştir.

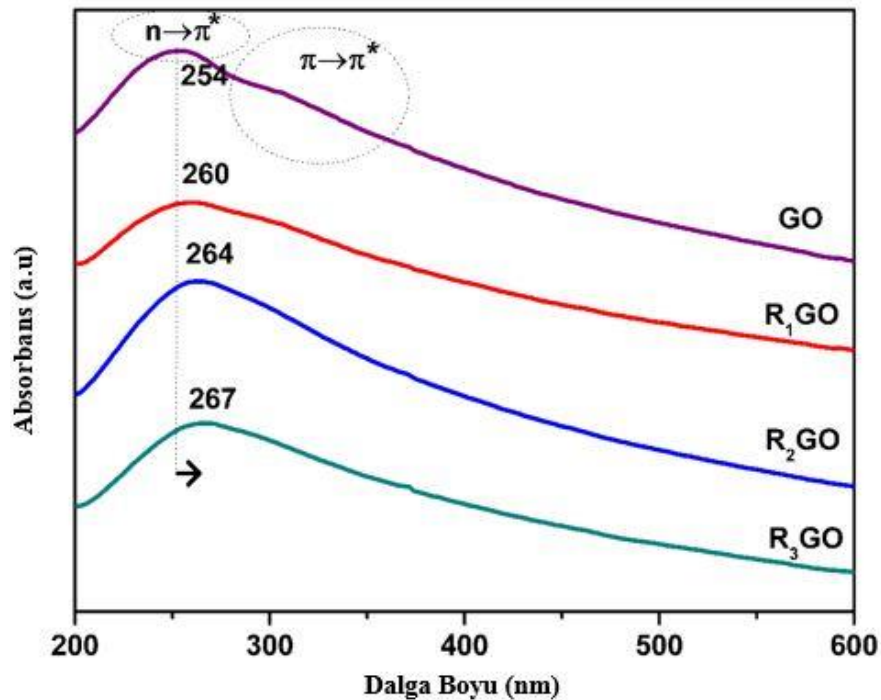


Şekil 4.10. Hazırlanan GO, R1GO, R2GO ve R3GO (0,5 mg/mL) çözeltilerinin (a) öncesi ve (b) iki gün boyunca hareketsiz olduktan sonraki fotoğrafları.



Şekil 4.11. Biyomineralizasyon öncesi GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun Raman analizi.

DI-H₂O'da dağılmış GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun UV-Vis absorpsiyon spektrumları Şekil 4.12.'de gösterilmektedir. GO süspansiyonunun 254 nm civarındaki zirve ve 307 nm civarındaki omuz piki sırasıyla aromatik C-C bağlarının $\pi-\pi^*$ geçişi ve C=O bağlarının $n-\pi^*$ geçişi nedeniyle görülmüştür. İndirgeme sonrasında, karbonil gruplarının yapıdan uzaklaştırılması anlamına gelen 307 nm'deki omuz RGO'lar için kaybolmaya başlamıştır. 254 nm'deki pikin NaBH₄ konsantrasyonunun artmasıyla R1GO, R2GO ve R3GO için sırasıyla 260, 264 ve 267 nm'ye kaydığı görülmüştür. Gözlemlenen spektrumun maksimum zirvesinin kırmızıya kayması GO yüzeyi üzerindeki bazı gruplara atfedilebilir. Kaymanın meydana gelmesi grafen tabakaları içinde indirgeme ile elektronik konjugasyon restorasyonu yapıldığı anlamına gelmektedir [217, 225]. Piklerin spektrumda sağa doğru kayması GO numunelerinin indirgeme işleminin gerçekleştirilmesinin belirlenmesinde fayda sağlamaktadır. Elektron restorasyonu ile GO'nun NaBH₄ ile indirgenmesi sonucu karbonil bağına atfedilen absorpsiyon omuz piki artık mevcut değildir [226, 227]. Böylece oksijen içeren fonksiyonel grupların GO'dan çıkarılması UV-Vis ölçümleri ile desteklenmiştir.



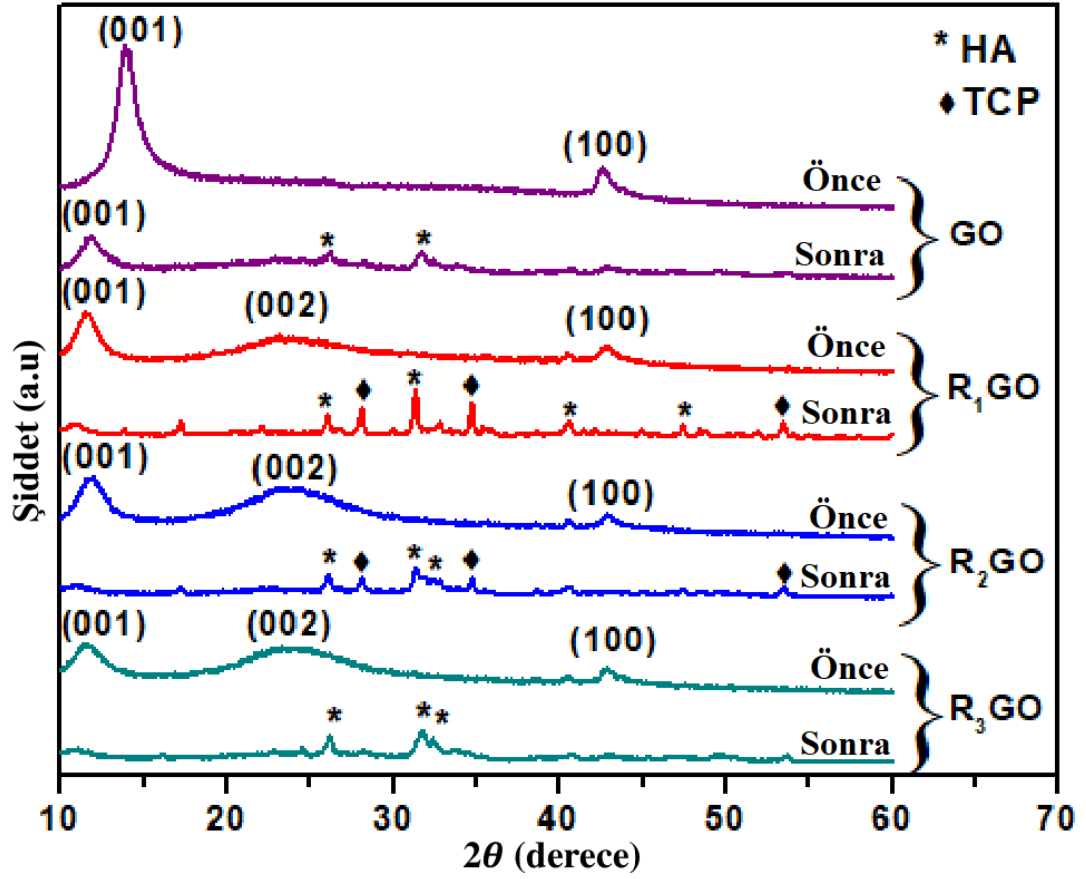
Şekil 4.12. Biyomineralizasyondan önce GO GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.

3 hafta boyunca 5xSBF'de biyomineralizasyon öncesi ve sonrası çeşitli konsantrasyonlarda NaBH_4 kullanan GO ve RGO'ların XRD paternleri Şekil 4.13.'te gösterilmektedir. Biyomineralizasyondan önce GO ve RGO'lar için (001), (002) ve (100) düzlemlerine karşılık gelen pikler sırası ile $13,8^\circ$ ve $23,3^\circ$ ve $42,6^\circ$ 'da yer almaktadır.

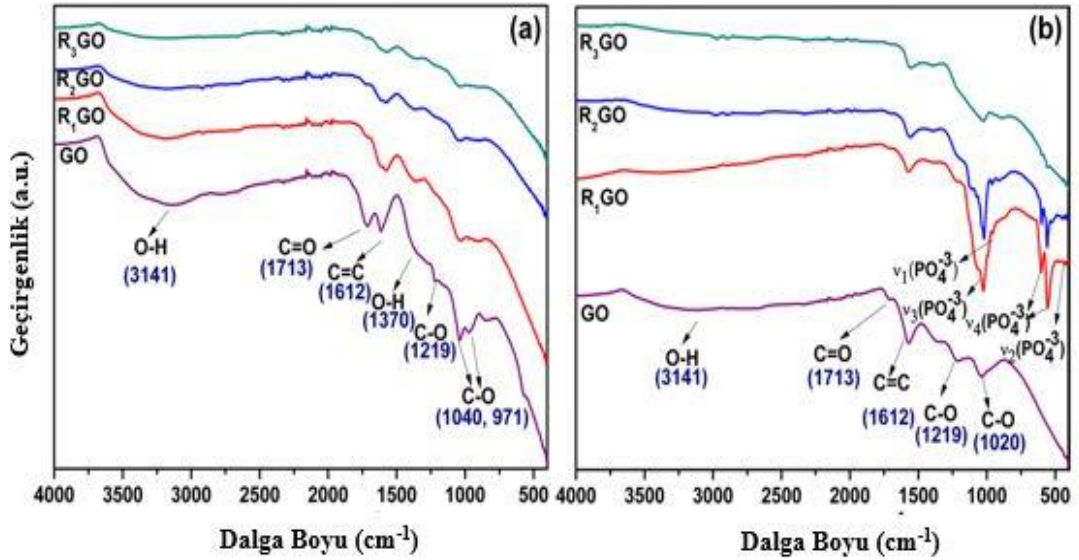
Oksijen içeren çeşitli fonksiyonel grupların (hidroksil, epoksi ve karboksil) yer aldığı katmanlar arasındaki bazal boşlukların (d_{basal}) GO için $7,6 \text{ \AA}$ ($2\theta=11,6^\circ$) iken RGO için $6,4 \text{ \AA}$ ($2\theta=13,8^\circ$) olması aglomeratların oluşumuna yol açan RGO'lar arasındaki π - π etkileşimine atfedilebilir [228]. GO'nun indirgenmesi ile (001) pikinin şiddeti önemli ölçüde azalırken fonksiyonel grupların kaldırıldığı anlamına gelen (002) piki $23,3^\circ$ ($3,80 \text{ \AA}$) yakınlarında ortaya çıkmıştır. Bu tür geniş pikin görünümü ayrıca katmandan oluşan RGO tabakalarının aglomerasyonuna atfedilmektedir [229].

Biyomineralizasyon sonrası XRD paternleri incelendiğinde hegzagonal HA'nın (ICDD kartı no. 09-0432) ve TCP'nin (ICDD kart no. 09-0169) ana karakteristik pikleri görülmektedir. HA ve TCP piklerinin şiddetleri azalan düzende sırasıyla R1GO, R2GO, R3GO ve GO şeklindedir ve bu sonuçlar diğer analiz sonuçlarıyla tutarlıdır.

Biyomineralizasyon öncesi GO indirgenmesi (Şekil 4.14.a) ve biyomineralizasyon sonrası HA/TCP oluşumu (Şekil 4.14.b) FTIR analizi ile incelenmiştir. Şekil 4.14.a'daki mor renkli olan GO'ya ait spektrum grafitin başarılı şekilde oksidasyonunu doğrulamaktadır. GO için ayrıntılı olarak bakıldığında O-H gerilme titreşimleri 3000 - 3500 cm^{-1} (geniş) ve 1370 cm^{-1} 'de [230], C=O (karboksil grupları) gerilme titreşimleri 1713 cm^{-1} 'de, moleküler suyun $\delta_{\text{O-H}}$ ile çakışabilecek olan C=C iskelet gerilme titreşimleri ise 1612 cm^{-1} 'de, C-O gerilme titreşimleri (epoksi ve alkoksi) 1350 - 950 cm^{-1} aralığında [226, 231] görülmektedir. Genel olarak RGO'ların spektrumları GO'nunkine benzer olmasına rağmen oksijen fonksiyonel gruplarıyla ilişkili piklerin yoğunluğu GO'dan R3GO'ya doğru önemli ölçüde azalmış olması Raman sonuçlarıyla da tutarlı olarak GO'nun başarılı bir şekilde RGO'ya indirgenmiş olduğunu göstermektedir [225].



Şekil 4.13. Biyomineralizasyon öncesi ve sonrası GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun XRD analizi.



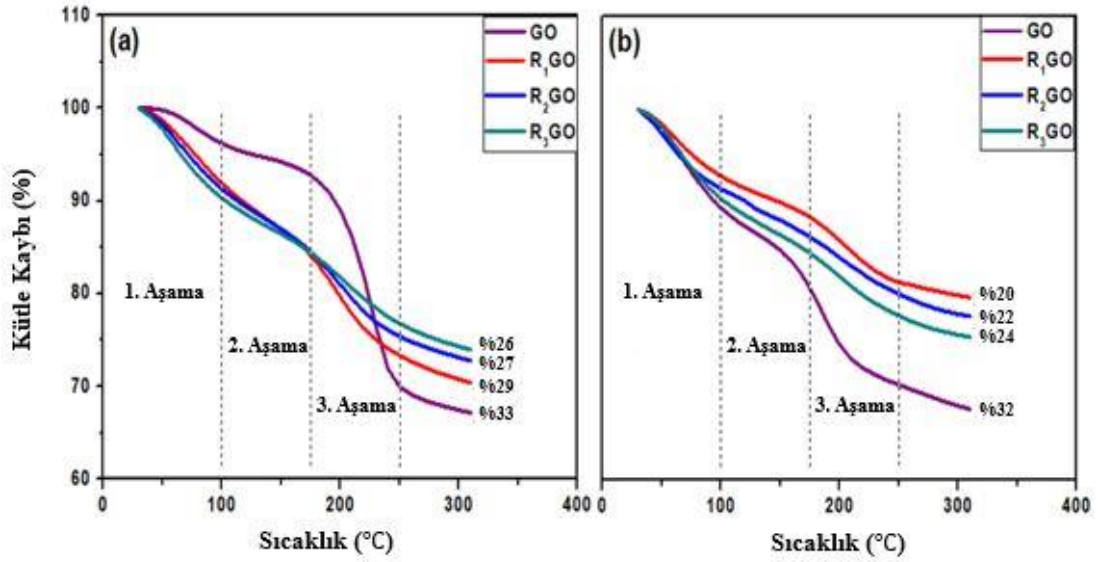
Şekil 4.14. GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin (a) biyomineralizasyondan önce ve (b) sonra FTIR spektrumları.

Pik yoğunlukları R1GO, R2GO ve R3GO için sırasıyla 0,1, 0,3 ve 0,5 olan indirgen molaritesinin artmasıyla azalırken sp^2 hibriti olan C=C (düzlemsel gerilme) gerilme titreşimleri 1612 cm^{-1} 'de [216, 232] sabittir. 3 hafta boyunca 5xSBF içinde biyomineralizasyonun ardından Şekil 4.14b'de gösteril fosfat (PO_4^{3-}) grubu karakteristik bantları şu şekildedir: yaklaşık 456 cm^{-1} 'deki bantlar ν_2 (OPO) bükme moduna; 546 ve 600 cm^{-1} 'de iki bant karakteristik ν_4 (OPO) bükme moduna; 959 cm^{-1} bandı ν_1 (PO) simetrik gerilme ve $1100-1000\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki çift ν_3 (PO) antisimetrik gerilme moduna karşılık gelmektedir. Bu bantlar apatit örgüsünde PO_4^{3-} polihedronlarının karakteristik moleküler yapılarını göstermektedir [213]. En yüksek fosfat piklerinin sırasıyla R1GO ve R2GO'da olduğu açıktır ve böylece FTIR sonuçlarının XRD sonuçlarını desteklediği görülmüştür.

Biyomineralizasyon öncesi ve sonrası GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun termal stabiliteleri ve GO'nun indirgenme işlemi açıklamalarının derinleştirilmesi için N_2 atmosferinde yapılan TGA analiz sonuçları Şekil 4.15.'de verilmiştir. Şekil 4.15.a'ya bakıldığında numuneler ısıl olarak kararsızdır ve 1. Aşama 100°C 'ye kadar adsorbe edilmiş suyun uzaklaştırılmasına, $100^\circ\text{C}-175^\circ\text{C}$ aralığındaki 2. Aşamada hidroksil gruplarının pirolizine, $175^\circ\text{C}-250^\circ\text{C}$ aralığındaki 3. Aşama sırasındaki önemli kütle kaybı ise GO yüzeyindeki diğer stabil olmayan oksijen içeren fonksiyonel grupların CO ve CO_2 şeklindeki pirolizine karşılık geldiği söylenebilir [216, 220, 233].

3. Aşamaya bakıldığında, en fazla % kütle kaybının epoksi ve karboksil grupları gibi fonksiyonel gruplar nedeniyle GO'da gözlenmesi başarılı bir şekilde indirgendiğini göstermektedir. Öte yandan termal olarak kararsız olan oksijen içeren fonksiyonel gruplarının kimyasal indirgeme ile giderilmesi sonucu GO, R1GO, R2GO ve R3GO için kütle kayıpları sırasıyla %33, %29, %27 ve %26 bulunmuştur ve GO'dan R3GO'ya artan termal stabilite gözlenmiştir. Bu bilgi RGO'lerin $NaBH_4$ tarafından kademeli olarak daha fazla termal kararlılığa sahip olduklarını düşündürmektedir [234]. Biyomineralizasyon sonrası numunelerin TGA analizine bakıldığında (Şekil 4.15.b) HA/TCP'nin yüksek termal stabilitesi nedeniyle numunelerin kütle kaybının azaldığı görülmüştür [223].

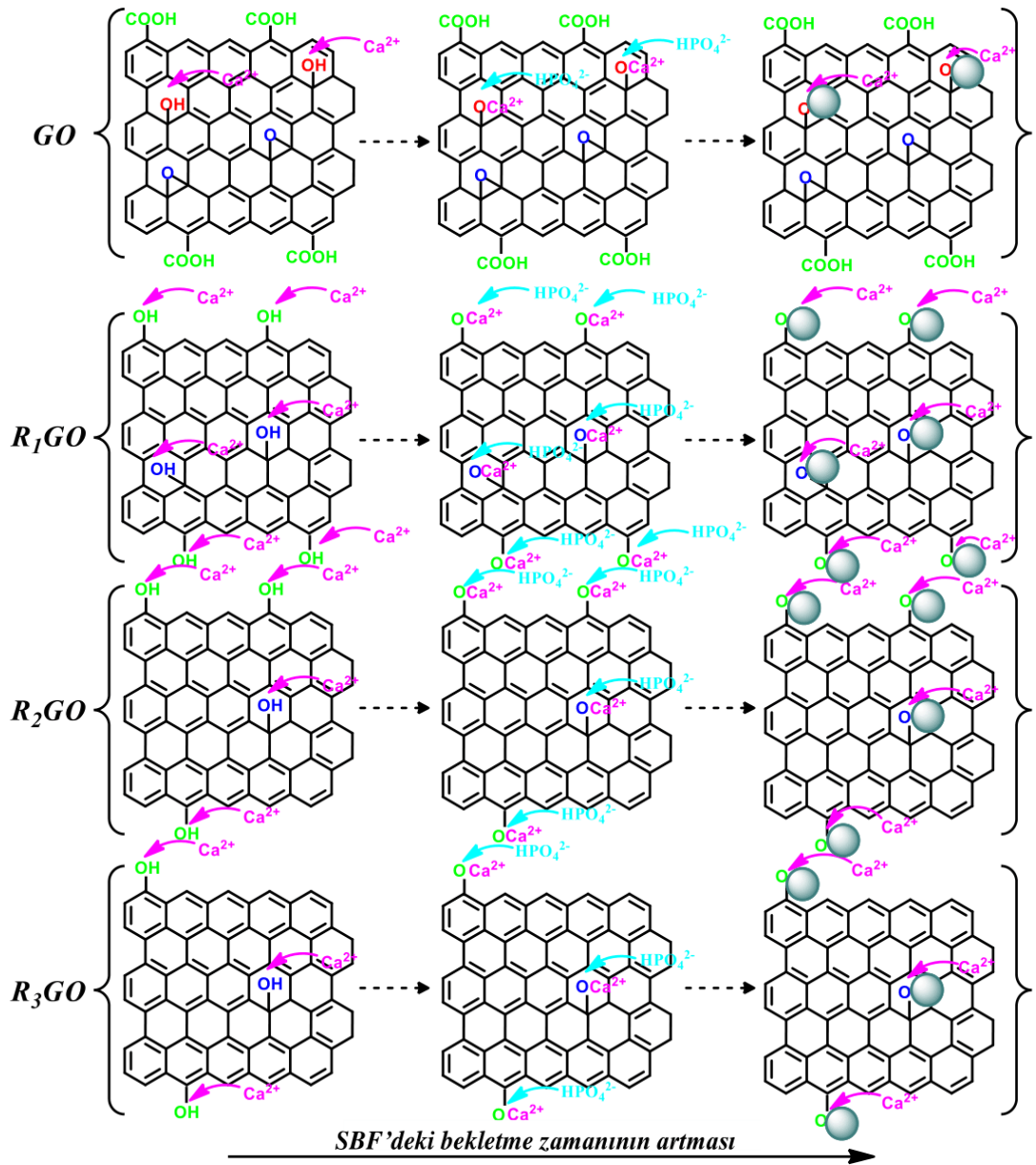
Biyomineralizasyon sonrası GO, R1GO, R2GO ve R3GO kütle kayıpları sırasıyla %32, %20, %22 ve %24 olarak bulunmuştur. XRD sonuçları ile tutarlı şekilde kütle kaybı yüzdesi küçükten büyüğe şu şekilde değişmektedir: R1GO, R2GO, R3GO ve GO. Biyomineralizasyon öncesi GO, R1GO, R2GO ve R3GO'nun 2. Aşamadaki kütle kayıpları sırasıyla %3,3, %7,6, %6,6 ve %5,4 iken biyomineralizasyon sonrası 2. Aşamada kütle kayıpları sırasıyla %8,5, %4,4, %5,2 ve %5,8 olarak bulunmuştur. Bu bilginin ışığında Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonlarının R1GO'nun yüzeyinde olduğu gibi hidroksil bakımından zengin yüzey üzerinde çekirdeklenmeye daha afiniteli olduğu sonucu çıkarılmıştır.



Şekil 4.15. GO, R1GO, R2GO ve R3GO numunelerinin (a) biyomineralizasyondan önce ve (b) sonraki TGA analizleri.

Yukarıdaki bilgilerle tutarlı şekilde GO, R1GO, R2GO ve R3GO üzerinde HA/TCP'nin elektrodepozisyonu için önerilen model Şekil 4.16.'da gösterilmiştir. Daha önceki literatür çalışmalarında [154, 155, 235, 236] GO ve RGO yüzeylerinde kemik benzeri apatit birikimi gerçekleştirilmiş fakat farklı indirgeme oranlarının biyomineralizasyon süreci üzerine etkisi daha önce incelenmemiştir. Bu çalışmada, kemik benzeri HA/TCP birikimini etkileyen oksijen içeren fonksiyonel grupların (epoksi, hidroksil ve karboksil) etkisi, diğer çalışmalardan farklı olarak ilk kez incelenmiştir.

Biyomedikal alanda kullanılmak üzere GO içeren yapıların biyomineralizasyon sürecinin nasıl yürütüldüğü açıklanmaya çalışılmıştır. Şekil 4.16.'dan görülebileceği gibi biyomineralizasyon işleminin süresi belirli indirgeme oranı ile başarıyla kısaltılmıştır. Vücuda implante edilen materyalin biyouyumluluğunu arttırdığından dolayı bu artan biyomineralizasyon hızının doku mühendisliği alanında umut verici bir gelişme olduğu düşünülmektedir. Bu sonuç GO materyalinin belirli bir indirgenme oranıyla biyouyumluluğunu ve in-vivo kemik oluşumu için uygunluğunu arttıracaktır.



Şekil 4.16. SBF'de biyomineralizasyon süreleri ile yüzeydeki HA/TCP çekirdeklenmesinin olası mekanizması (küresel şekiller HA/TCP çekirdeklenmesini temsil eder).

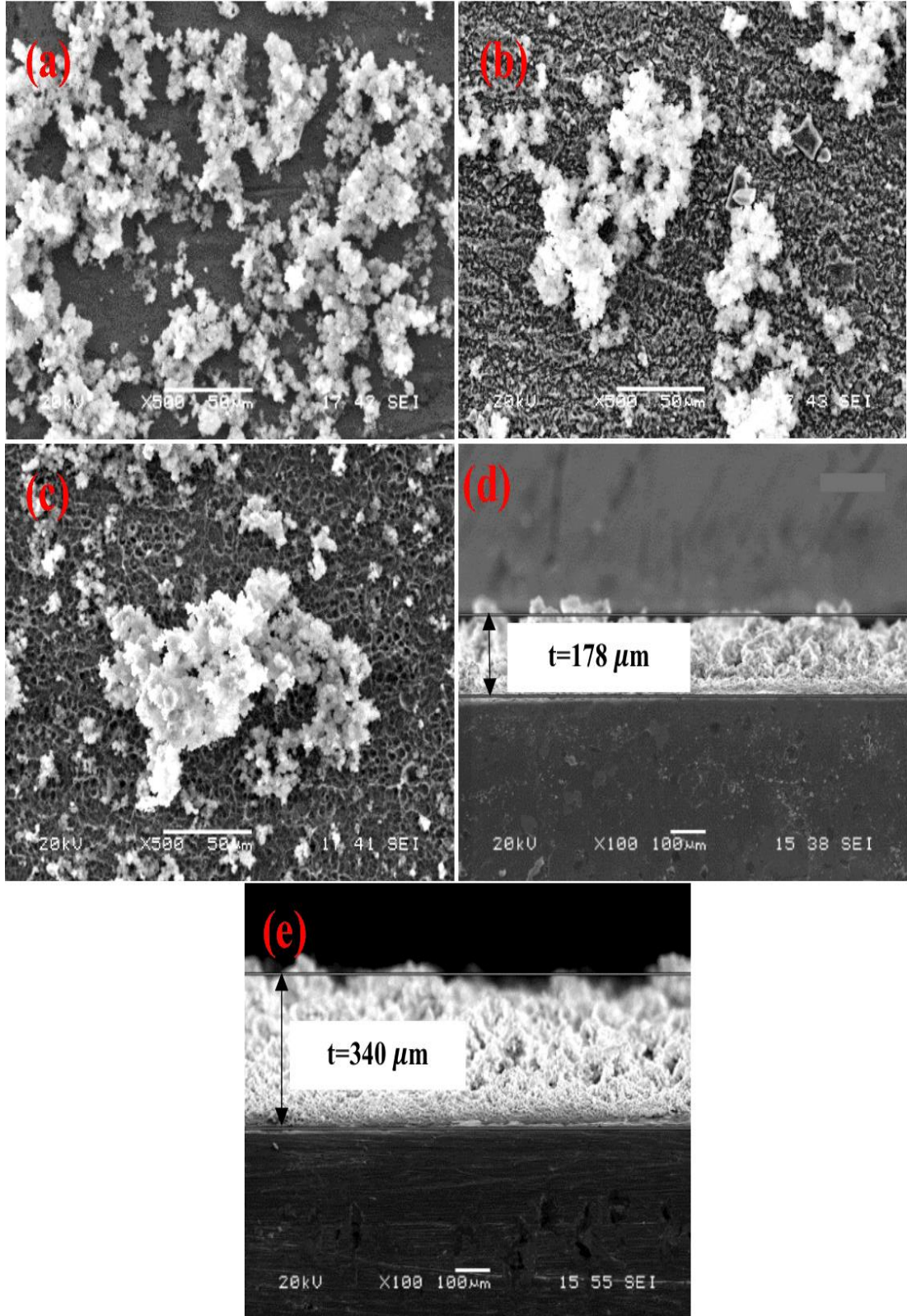
4.3. Ti Üzerinde Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Oluşumunda Ön İşlemlerin Karşılaştırılması Çalışması

Saf Ti plakalarının 1,5xSBF'deki ilk hafta sonunda NaOH, HCl ve NaOH+HCl ön yüzey işlemleri uygulanmasının ardından elde edilmiş olan SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.17. a, b ve c'de verilmiştir. HA tabakasının diğer ön yüzey işlemlerine kıyasla NaOH ön yüzey işlemi uygulanan Ti numunesinin yüzeyi boyunca daha homojen ve sık olarak çekirdeklendiği ve biriktiği bulunmuştur.

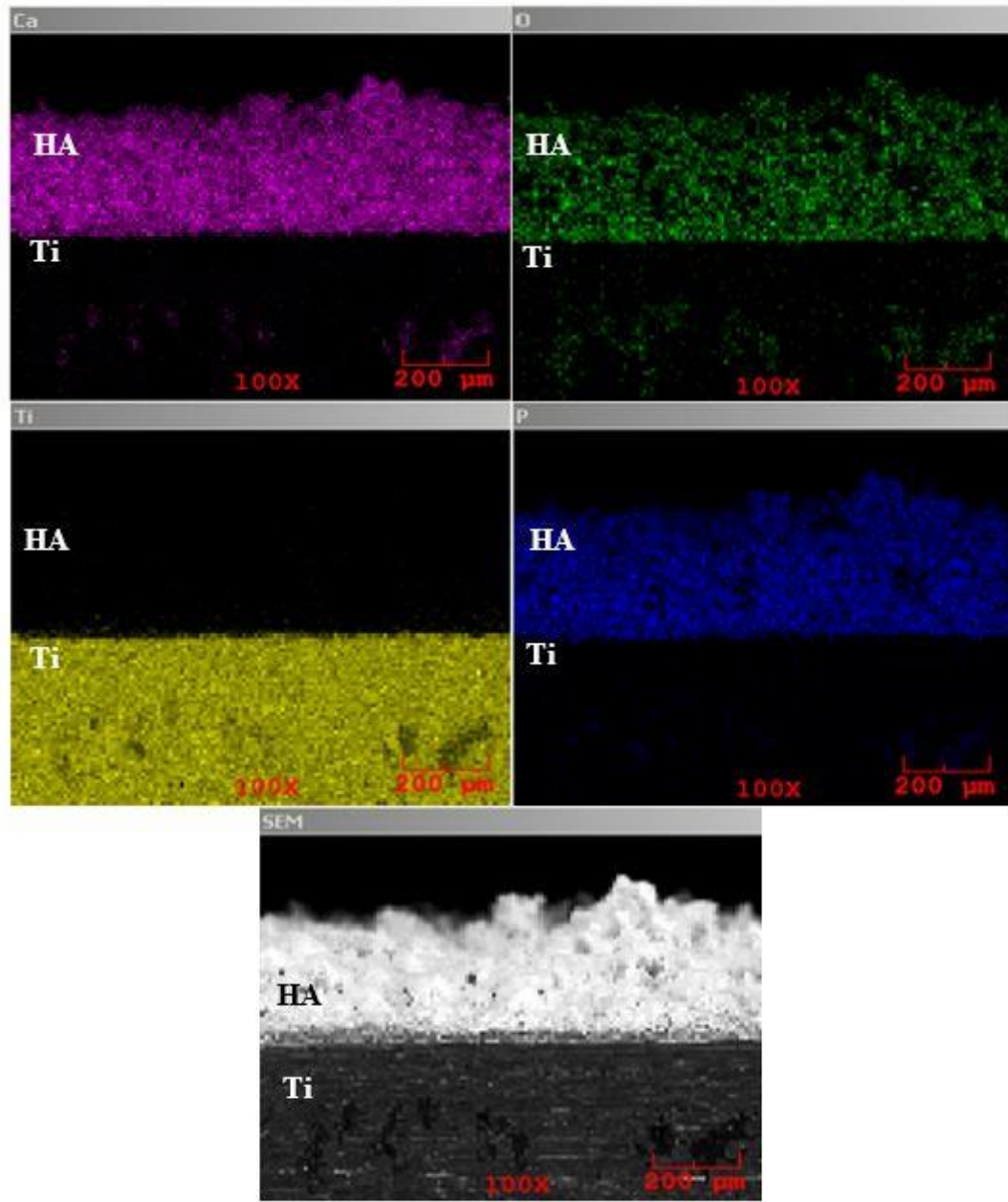
Küme şekilli morfolojideki nano HA tozlar 1,5xSBF'de bir araya gelmiş formda elde edildiği Şekil 4.17.a'da gözlemlenmiştir. Alkali işlemle elde edilen sodyum titanat tabakasının kalsiyum, fosfat ve yüzey arasındaki elektrostatik etkileşimler açısından asidik işlemle elde edilen titanyum hidrit (TiH_2) tabakasından daha etkili olduğu düşünülmektedir.

SEM ve EDS analizi ile desteklenen NaOH ön yüzey işlemleri Ti yüzeyinin 1,5xSBF'de dört hafta boyunca bekletilmesine devam edilmiştir. Sırasıyla Şekil 4.17.d ve Şekil 4.17.e'den gözlemlendiği gibi kalsiyum ve fosfat iyonlarından oluşan tabakanın ikinci haftadan dördüncü haftaya kadar katman katman arttığı ve kaplama kalınlığının 178 μm 'den 340 μm 'ye ulaştığı bulunmuştur.

Ayrıca HA yapısında bulunan elementler dördüncü haftanın sonunda elementel haritalama ile görülmüştür (Şekil 4.18.). Elementel analiz SBF'de bekletmeyle elde edilen HA birikiminin Şekil 4.17.'de gösterildiği gibi HA'nın çekirdekleşmesinden sonra kalsiyum, fosfat iyonları ve yüzey arasındaki elektrostatik etkileşimlerin devam ettiğini göstermektedir. Ayrıca bifazik HA tozları, herhangi bir kalsiyum ve fosfat eklenmeden fizyolojik koşullarda 1,5xSBF'de biyomimetik yöntemle başarılı bir şekilde kaplanmıştır.

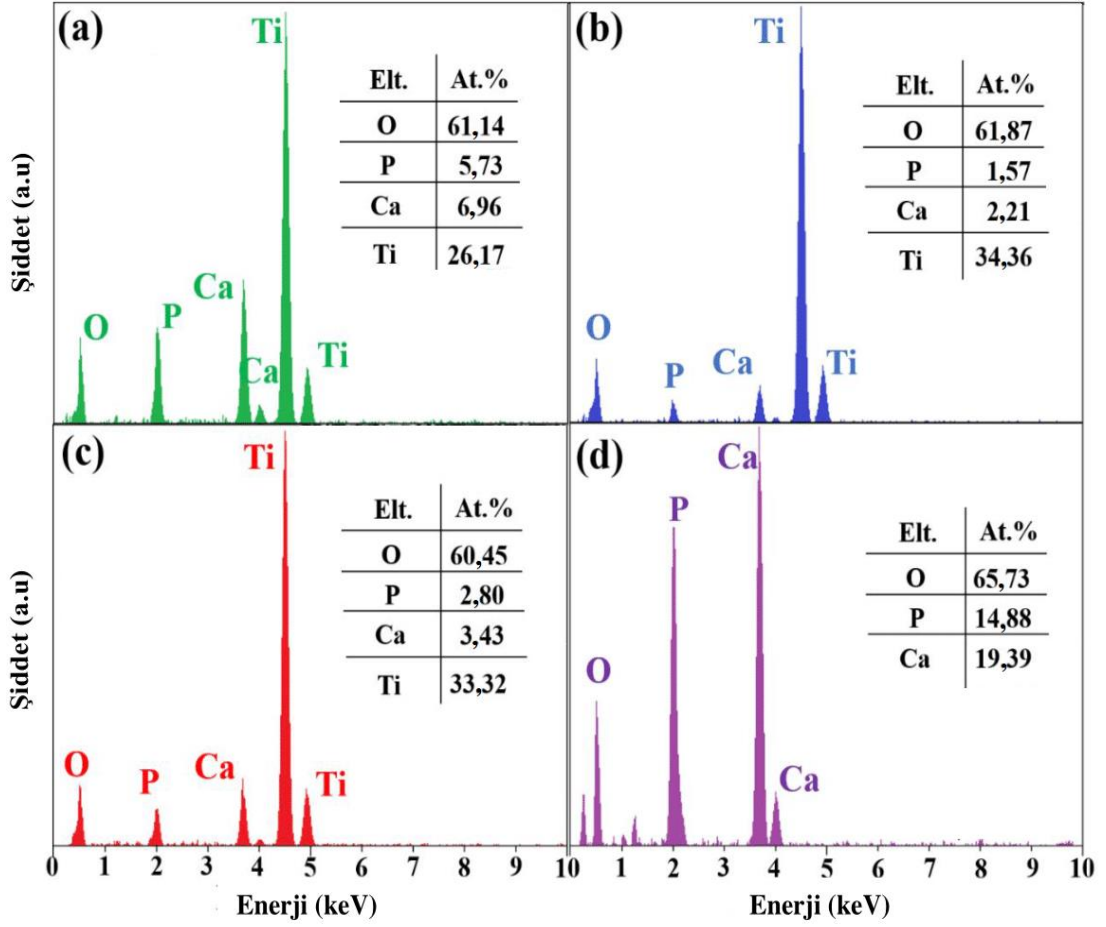


Şekil 4.17. (a) NaOH (b), HCl ve (c) NaOH+HCl ile ön yüzey işleme tabi tutulmuş Ti numunelerinin 1 hafta SBF’de bekletilmesi sonrası; NaOH işleminden sonra (d) 2 ve (e) 4 hafta sonunda kaplama kalınlıkları.



Şekil 4.18. SEM-EDS analizi ve dördüncü haftanın sonunda Ti plakasının kesitindeki elementlerin dağılım haritaları.

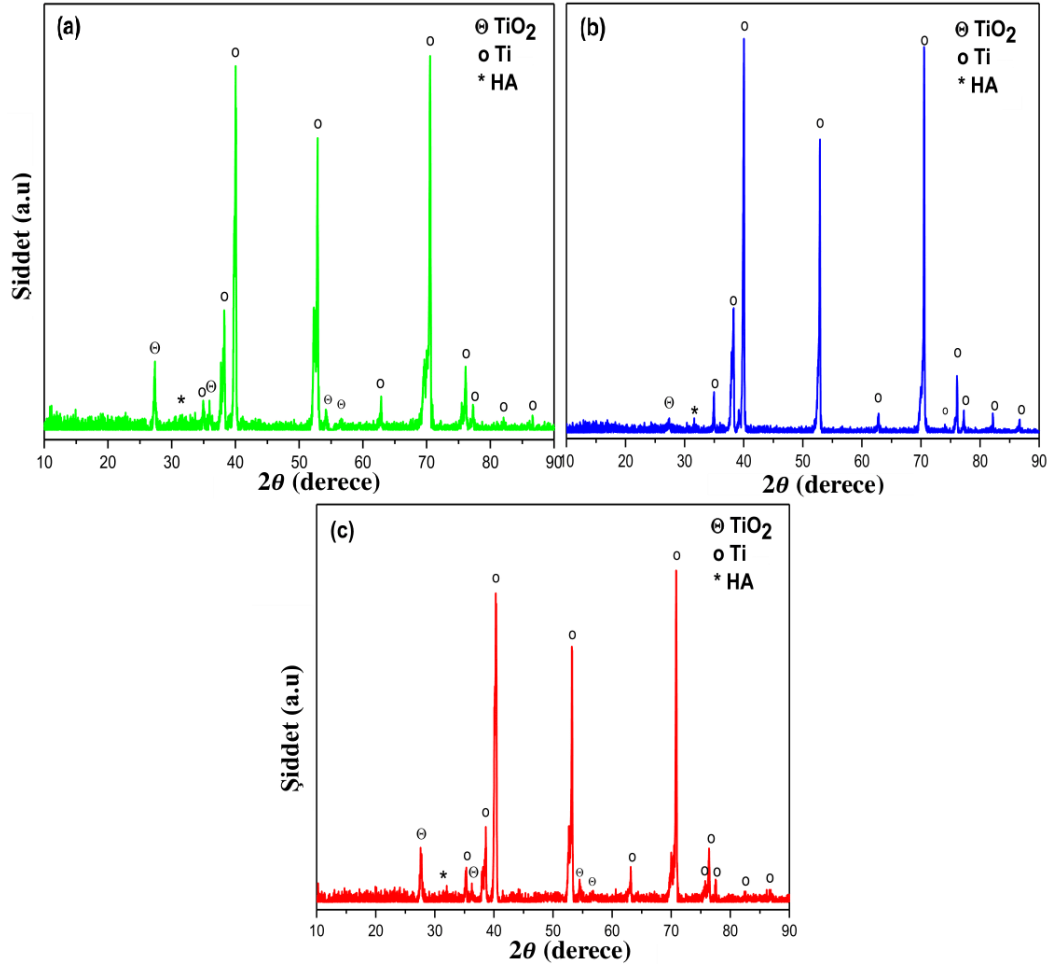
Şekil 4.19.'da gösterilen EDS alan analizi sonuçlarında yer alan tablolara bakıldığında NaOH ön yüzey işleminden geçirilmiş kaplamanın en yüksek kalsiyum ve fosfor oranına sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, dördüncü hafta sonunda 1,5xSBF'de kaplanmış bifazik HA tozlarının Ca/P oranı (Şekil 4.19.d) insan kemiğindeki Ca/P oranına (1,5) yakın bir değerde (1,3) bulunmuştur [237].



Şekil 4.19. (a) NaOH, (b) HCl ve (c) NaOH+HCl ile ön yüzey işlemi sonrası Ti numunelerinin 1,5xSBF’de ilk hafta sonundaki ve (d) dördüncü hafta sonunda kaplanan bifazik HA tozlarının EDS analizleri.

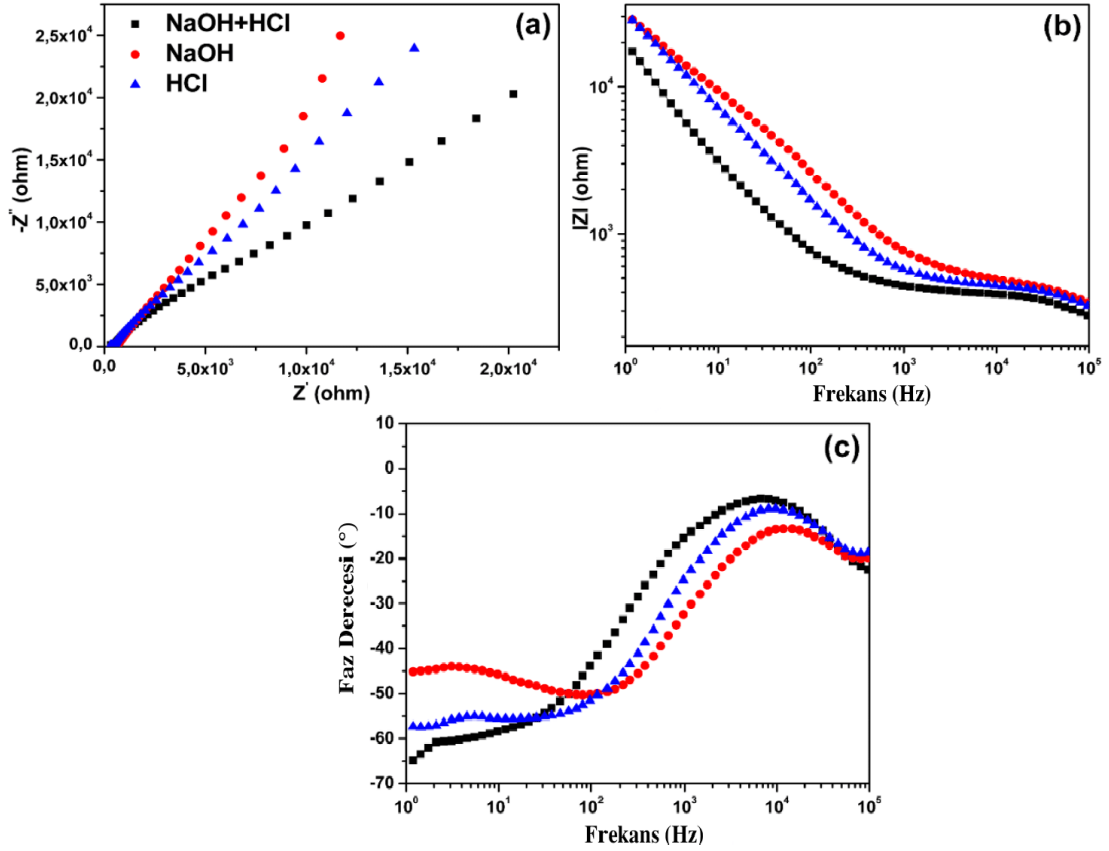
NaOH (Şekil 4.20.a), HCl (Şekil 4.20.b) ve NaOH+HCl (Şekil 4.20.c) ön yüzey işlemlerinin uygulanmasının ardından 1,5xSBF içinde bir hafta boyunca kaplanmış olan Ti plakalarının tüm XRD desenlerinde HA’nın ilk haftanın sonunda çekirdeklenmeye başladığını gösteren HA’nın (ICDD PDF kartı No. 09-0432) yüzölçümü piki görülmüştür.

Ayrıca TiO₂ (Rutil) fazı tüm numunelerde görülmüş ve pik şiddetlerine bakıldığında 600°C’de 1 saat ısıtılma işlemi sonrasında NaOH ön yüzey işlemlili numunede diğerlerine kıyasla (Şekil 4.20.b, c) daha fazla oluştuğu söylenebilmektedir. Oluşan TiO₂ tabakasının HA oluşumunu desteklediği de bilinmektedir [238].



Şekil 4.20. 1,5xSBF’de ilk hafta sonunda (a) NaOH, (b) HCl ve (c) NaOH+HCl ön yüzey işlemlili Ti numunelerinin XRD analizleri.

SBF çözeltilerinde NaOH+HCl, NaOH ve HCl işlemlili Ti numuneleri için açık devre potansiyeli durumunda Nyquist ve Bode grafikleri sırasıyla Şekil 4.21.a, b ve c’de gösterilmiştir. Nyquist grafiklerinde yarım daire çapı şu sırayla artmaktadır: NaOH+HCl<HCl<NaOH. 1,5xSBF’de birinci hafta sonunda elde edilen sonuç kaplama korozyon direncinin ön yüzey işlemine bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca Bode grafiklerindeki farklı numunelerin korozyon direncini değerlendirmek için kullanılan parametrelerden biri olan düşük frekanslı empedans modülü $|Z|$ (Şekil 4.21.b) daha büyük olduğunda daha iyi bir korozyon koruma performansı göstermektedir [239]. Şekil 4.21.a’daki Nyquist grafikleri ile uyumlu şekilde $|Z|$ değerlerinin şu sırayla arttığı gözlemlenebilir: NaOH+HCl<HCl<NaOH. NaOH işlemi uygulanmış Ti daha düşük bir biyobozunma hızına ve HCl ön-işlemlili numuneye kıyasla daha fazla iyon salınımını önleyen bir yüzeye sahiptir.

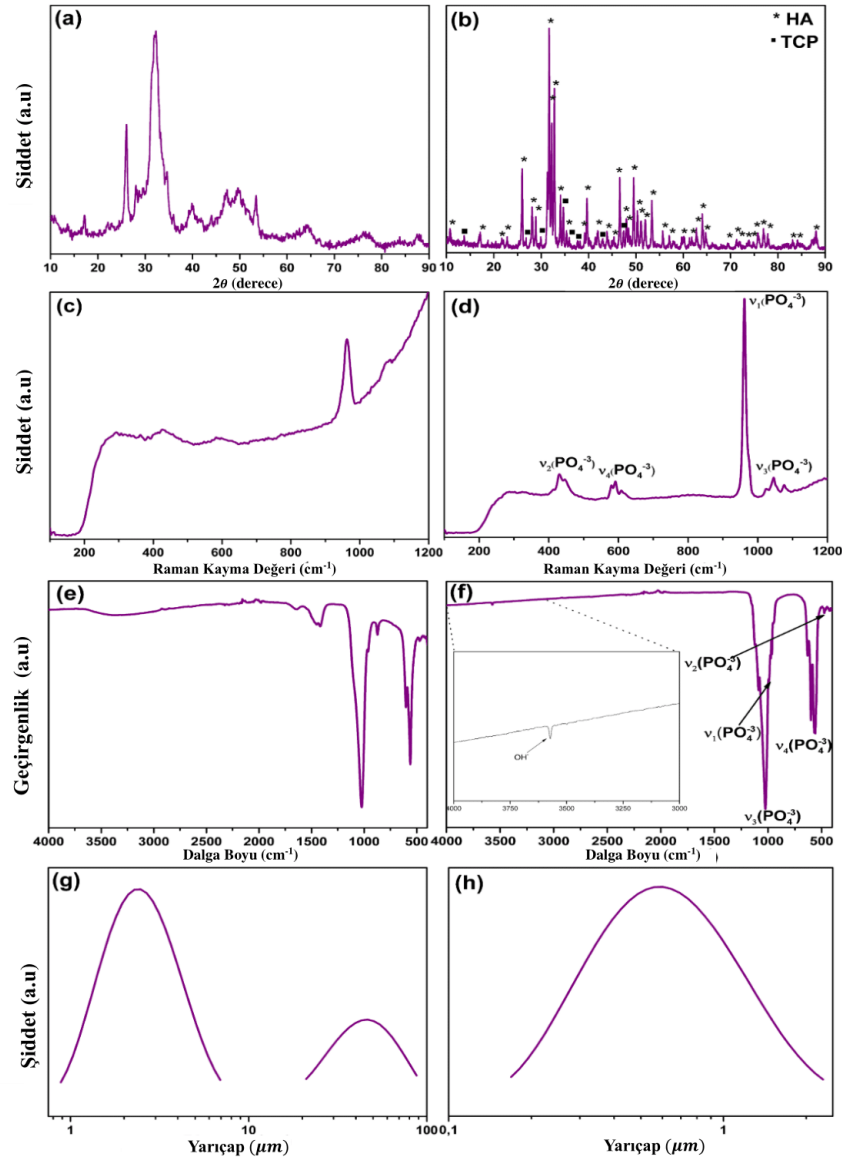


Şekil 4.21. SBF içerisindeki NaOH, HCl ve NaOH+HCl işlemleri Ti numunelerinin (a) Nyquist grafiği, (b) $|Z|$ vs. Frekans (c) Faz derecesi vs. Frekans Bode grafikleri.

Elde edilen kaplanmış numunenin kristal boyutu, kristalinitesi ve yoğunluğu tez kapsamında olan önceki çalışmalarda bahsedildiği şekilde bulunmuştur. Yüksek kristaliniteye sahip HA'nın biyobozunurluğa yönelik afinitesinin olmadığı bilinmektedir ve sinterleme işlemi ile X_c 'nin arttığı görülebilir. [207]. Daha önce Raman analizinde bahsedildiği üzere HA'ya ait olan tüm pikler görünmektedir. Ayrıca, Raman spektrumunda 950°C 'de sinterlemeden sonra kristalinite derecesinin (Şekil 4.22.d) sinterlenmemiş tozlara (Şekil 4.22.c) kıyasla arttığı görülmüştür ve bu artma XRD analizi ile desteklenmektedir (Şekil 4.22.a, b ve Tablo 4.3.).

Sinterleme işlemi öncesi FTIR spektrumunda yaklaşık 1500 ve 860 cm^{-1} 'deki pikler (Şekil 4.22.e) kalsiyum karbonat (CaCO_3)'e aittir [240] ve beklendiği gibi 950°C 'de sinterleme sonrası FTIR spektrumunda görünmemişlerdir (Şekil 4.22.f) [241]. Böylelikle sinterleme öncesi (Şekil 4.22.e) ve sonrası (Şekil 4.22.f) FTIR analizleri XRD ve Raman sonuçlarını desteklemektedir.

Ortalama partikül boyut analizi için 1,5xSBF’de elde edilen kaplanmış biyomimetik bifazik HA tozları 1 saat sonikasyon kullanılarak suda dağıtılmasının ardından sinterleme öncesi ve sonrası uygun seyreltmedeki çözeltileri hazırlanmış ve ölçüm kuvetine alınarak analiz gerçekleştirilmiştir. Zetasizer kullanılarak ölçülen ortalama partikül boyutu Şekil 4.22.g ve h’de gösterildiği gibi sinterlenmiş bifazik HA tozu için 2,36 μm ile 46,32 μm aralığında ve sinterlenmiş bifazik HA tozu için 0,58 μm olarak ölçülen değerlerden sinterlemeden sonra daha düşük bir aglomerasyon eğilimine ve yüksek kristaliniteye sahip kaplanmış kemik tozlarının elde edildiği sonucuna varılabilir.



Şekil 4.22. Sinterleme öncesi ve sonrası elde edilen bifazik HA tozunun (a,b) XRD, (c, d) Raman analizi, (e, f) FTIR ve (g, h) partikül boyutu ölçümü analizi.

Tablo 4.3. HA numunesinin sinterleme öncesi ve sonrası kristaliniteleri ve kristal boyutları.

Numune	Uzay Grubu	Latis Sabitleri (Å)			Kimyasal Formül	FWHM (°)	2Theta (°)	Z	Yoğunluk (g/cm ³)	Birim Hücre Hacmi, Å ³	Ortalama Kristal Boyutu, D (nm)	Kristalinite, X _c
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>								
Sinter Öncesi	P6 ₃ /m (176)	9,432	9,432	6,881	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	0,407	31,421	2	3,146	530,1	21,19	0,21
Sinter Sonrası	P6 ₃ /m (176)	9,432	9,432	6,881	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	0,229	31,681	2	3,146	5	37,68	1,15

FWHM: (211), $2\theta = 31,77^\circ$ piklerinin maksimum şiddetlerinin yarı genişliği.

Z: Birim hücredeki molekül formül sayısı.

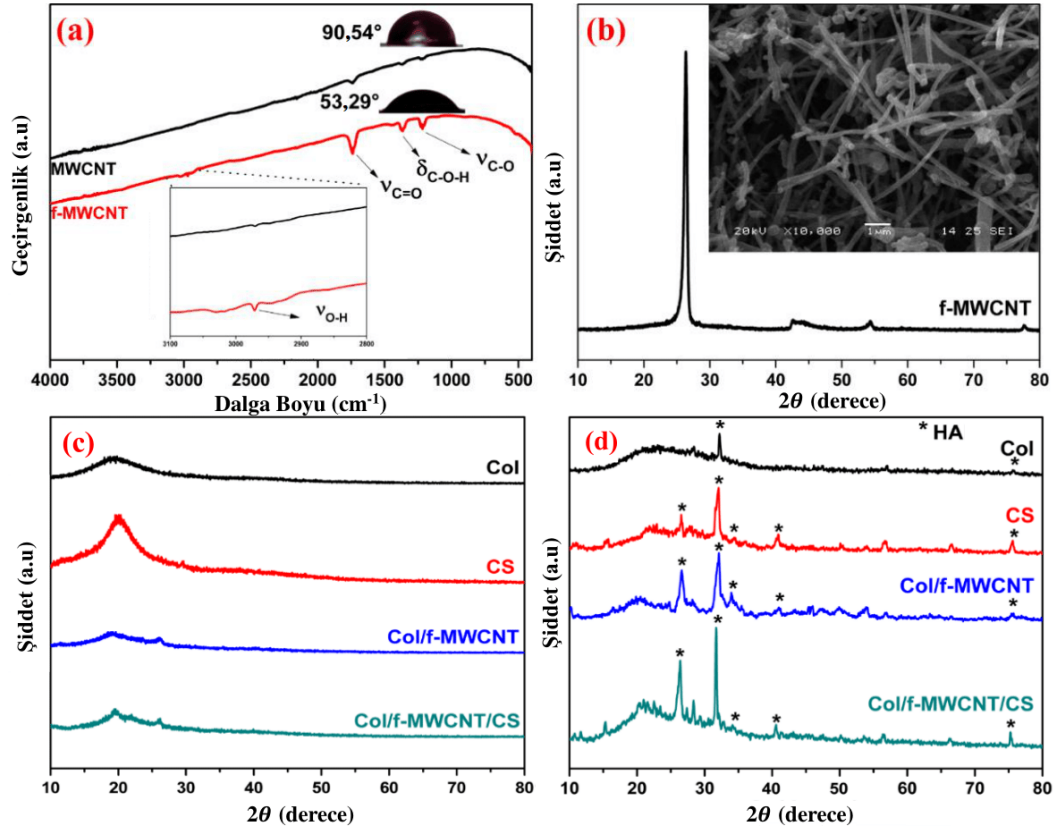
4.4. Kemik Doku Mühendisliği İçin 3B Gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA Kompozit İskeleler Çalışması

MWCNT nitrik asit işlemi kullanılarak hidroksil ve karboksil grupları ile modifiye edilmiştir. Bazı çalışmalarda saf MWCNT kullanılmış olmasına rağmen [242, 243] bu işlem Col çözeltisi ile homojen karışmaya izin vermekte, hidrojen bağları oluşturmakta (Şekil 4.23.) ve doğal MWCNT'lere kıyasla toksisitenin azaltılmasını [134] sağlamaktadır. fMWCNT'nin karakteristik gerilme frekansları olan V_{C-O} , δ_{C-O-H} , $V_{C=O}$, V_{O-H} frekansları sırasıyla 1218 cm^{-1} , 1353 cm^{-1} , 1738 cm^{-1} , 3000 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Oksijen içeren grupların artmasıyla hidrofilik etki artmış ve temas açısı $90,54^\circ$ 'den $53,29^\circ$ 'ye düşmüştür (Şekil 4.23.a) ve ayrıca oksijen içeriği nedeniyle morfolojide kırışıklıklar gözlenmiştir (Şekil 4.23.b). FTIR, temas açısı, XRD ve SEM analizleri karboksil ve hidroksil gruplarının fMWCNT yüzeyinde başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. Ayrıca, fMWCNT'lerin negatif yüklü yüzeyleri biyomineralizasyonu arttırmaktadır. %0,2 ağırlık hacim fMWCNT eklenerek [181] ve [244]'de bahsedildiği gibi in-vitro hücre biyoyumumluluğu için önemli olan iletkenlik de arttırılmıştır.

Elde edilen kontrol yapı iskelesinin ve biyomineralize yapı iskelesinin XRD paternleri sırasıyla Şekil 4.23.c ve d'de gösterilmiştir. Col ve CS 20° civarında geniş bir pik ile karakterize edilirken fMWCNT ilavesi ile Şekil 4.23.c'deki Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskelelerinin XRD paterninde 25° civarında meydana gelen pik fMWCNT'nin XRD paterni ile de uyumludur (Şekil 4.23.b). Biyomineralizasyon sonrası $31,9^\circ$ 'deki en güçlü pik olan (211) HA'ya [ICDD kartı no. 09-00432, hegzagonal, $P6_3/m$ uzay grubu (no. 176), $a=b=9,418$ ve $c=6,884\text{ Å}$] karşılık gelmektedir. HA fazının (002), (211), (202), (310) ve (215) düzlemlerine karşılık gelen ana difraksiyon pikleri sırasıyla $2\theta=26,5$, $32,3$, $34,2$, $40,8$ ve $75,6$ değerlerinde ortaya çıkması tüm yapı iskelelerindeki HA varlığını doğrulamaktadır.

Çekirdeklenmiş olan HA'ya ait piklerin tüm iskelelerde görülmesine rağmen, en yüksek yoğunluktaki pikler 3B Col/fMWCNT/CS iskelesinde bulunmuştur. Bu çekirdeklenme diğer iskelelere göre Col/fMWCNT/CS yapı iskelesinin yüksek

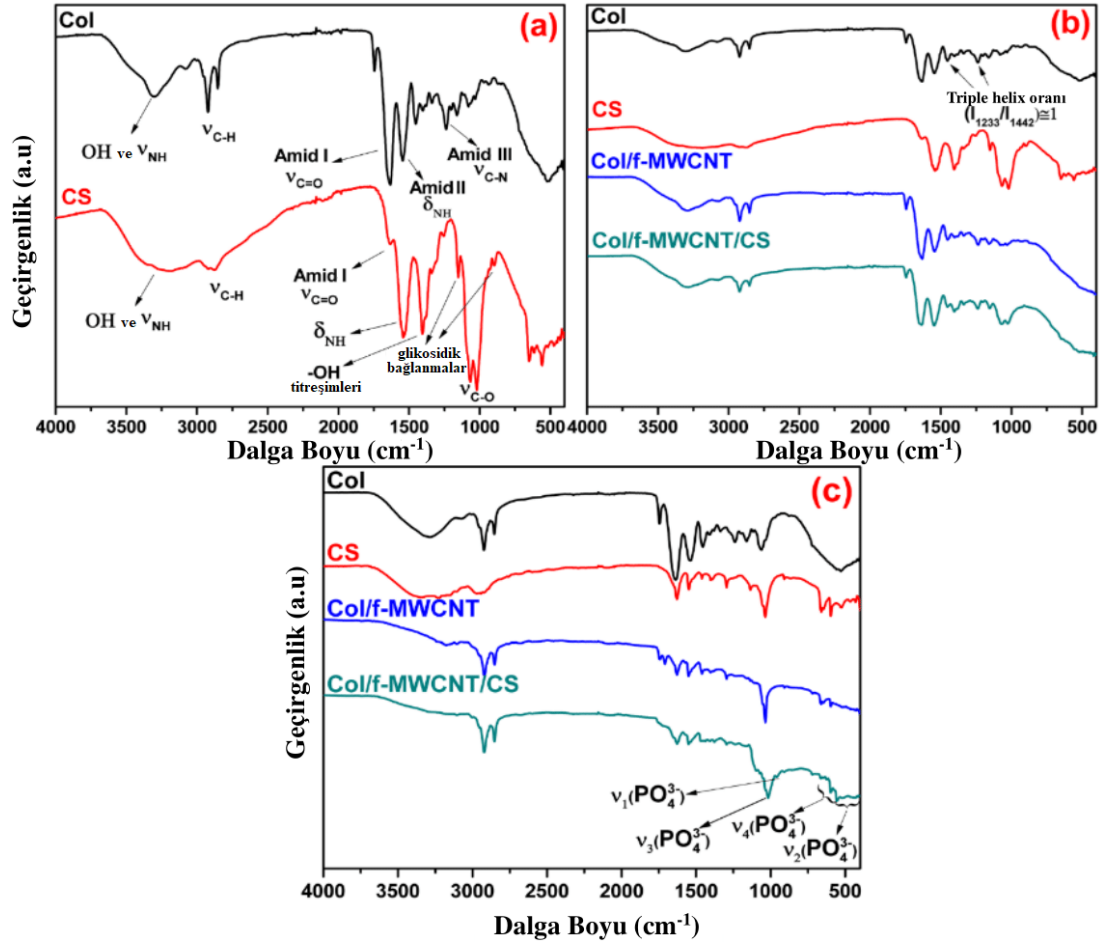
biyoaktiviteye sahip olduğunu da göstermektedir. Yapı iskelesi yüzeyinin HA'nın biyomineralizasyonu için nükleasyon bölgeleri olarak yeterli hidrofilikliğe ve fonksiyonel gruplara sahip olmasını *f*MWCNT ve CS molekülleri ile Col'ün kimyasal fonksiyonizasyonu sağlamıştır. Sonuç olarak HA'nın biyomimetik yöntemle Col/*f*MWCNT/CS yapı iskelesi yüzeyinde daha fazla birikebilir olduğu görülmüştür.



Şekil 4.23. (a) FTIR spektrumları ile temas açıları, (b) *f*MWCNT'nin XRD paterni ve SEM görüntüsü, 3B gözenekli Col, CS, Col/*f*MWCNT ve Col/*f*MWCNT/CS iskelelerinin (c) biyomineralizasyon öncesi ve (d) biyomineralizasyon sonrası XRD modelleri.

Biyomineralizasyondan önce ve sonra yapı iskelelerindeki moleküller arası etkileşimleri tanımlamak için Col, CS, Col/*f*MWCNT ve Col/*f*MWCNT/CS'nin FTIR spektrumları alınmıştır (Şekil 4.24.). Col üçlü helis yapısının bütünlüğünü belirlemek için 1233 ve 1442 cm^{-1} 'deki piklerin absorptans oranı kullanılmıştır (Şekil 4.24.b). Col molekülünde bulunan proteinlerin titreşim modları ile Şekil 4.24.a'daki gözlemlenen pikler uyumludur. Biyomimetik yöntemle yapılan Col, CS, Col/*f*MWCNT ve Col/*f*MWCNT/CS kompozit yapı iskelelerinde HA'nın varlığını Şekil 4.24.c'deki FTIR spektrumları göstermektedir ve HA karakteristik pikleri tüm yapı iskelelerinin

spektrumunda yer almaktadır. Col, CS ve HA yapı iskelelerine ait piklerinin karşılık geldiği yapılar Tablo 4.4.'te gösterilmiştir [245].



Şekil 4.24. Üretilen iskelelerin (a) ve (b) biyomineralizasyon öncesi ve (c) biyomineralizasyon sonrası FTIR spektrumları.

Bozulmamış Col yapıları için I_{1233}/I_{1442} değeri 1 civarında iken denatüre edilmiş Col için yaklaşık 0,5'tir. Elde edilen yapı iskeleleri için bulunan değer Şekil 4.24.b'de görüldüğü gibi yaklaşık 1 olarak bulunmuştur. Bu sonuç fMWCNT ve CS'nin eklenmesinin Col'ün üçlü sarmalını denatüre etmediğini ve yapı iskelesinin hazırlanma aşamasının Col moleküllerini bozmadığını onaylamaktadır. Col'ün mekanik ve biyolojik özelliklerinden molekül yapısının sorumlu olduğu düşünüldüğü için denatüre olmamış üçlü sarmal yapısı önemli bir özelliktir.

Şekil 4.24.c'den görülebileceği gibi, HA'nın Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS yapı iskeleleri üzerinde çekirdeklenmesi 3200-3400 cm^{-1} arasındaki OH^- gerilmesine karşılık gelen geniş absorpsiyon pikinin şiddetinin azalmasına neden olmuştur. Bu durum HA biyomineralizasyonu sonucu OH^- derişimindeki artış nedeniyle hidrojen bağlarının biyomineralize edilmemişlere kıyasla (Şekil 4.24.a,b) biyomineralize edilmiş yapı iskelelerinde (Şekil 4.24.c) daha güçlü olduğuna atfedilebilir. Yukarıdaki gözlemler sonucunda HA partiküllerine matris olarak hizmet eden Col/fMWCNT/CS kompozitinin HA partikülleri için bir anchoring yeri sağladığı ve diğer yapı iskelesi kompozitlerine kıyasla Col/fMWCNT/CS yapı bileşenlerinin birbiri ile daha fazla etkileşimde olduğu düşünülmektedir.

Tablo 4.4. Üretilen yapı iskelelerindeki Col, CS ve HA'nın FTIR analizleri.

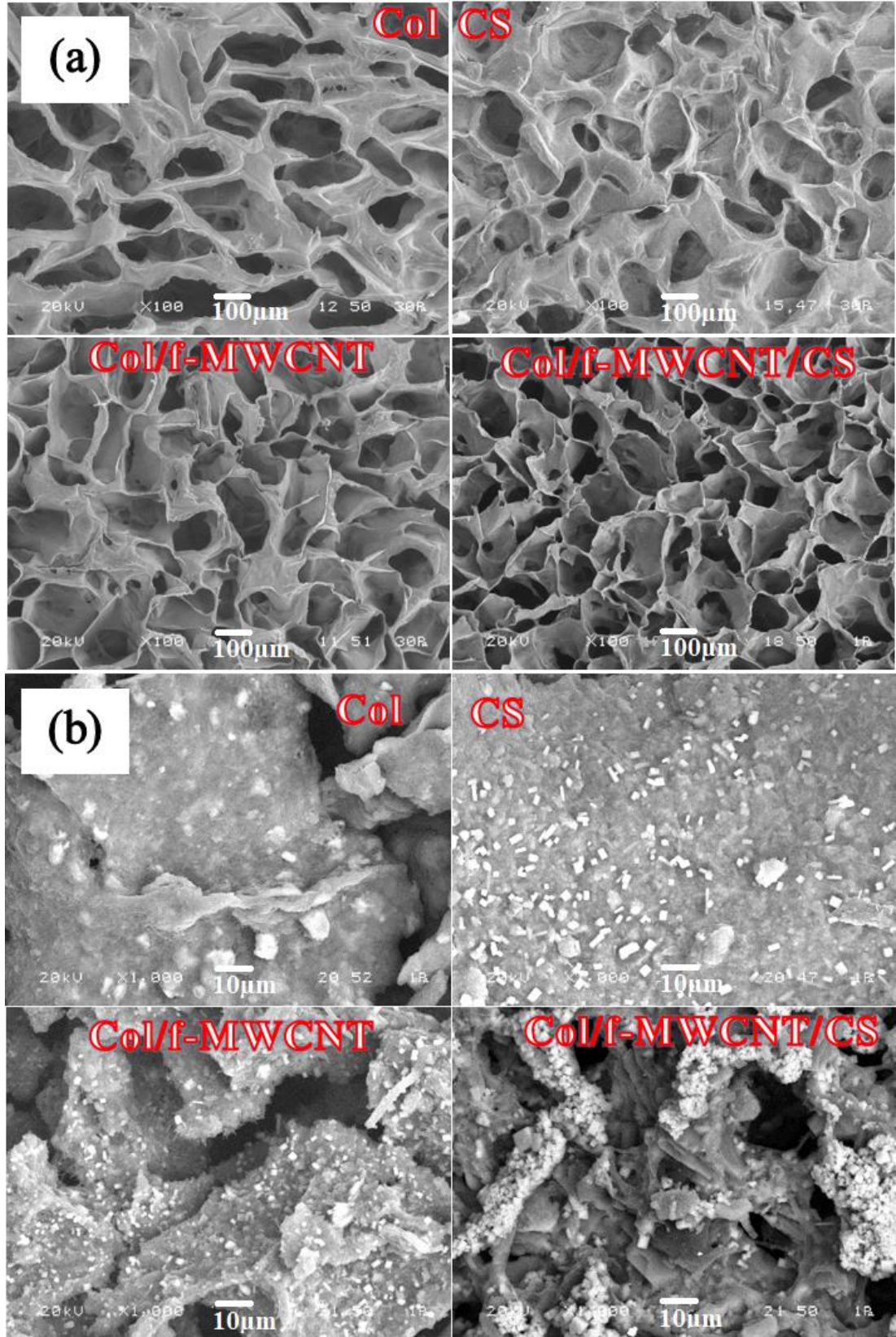
Dalga Sayısı (cm^{-1})	Karşılık Gelen Modlar
Kolajen	
3296	Amid A, N-H ve O-H gerilme
2926 ve 2853	Amid B, C-H gerilme
1600-1700	Amid I, C=O gerilme
1545	Amid II, N-H bükülme
1445-1455	CH_2 ve CH_3 deformasyon
1310-1340	CH_2 sallanma
1233	Amid III, C-N gerilme
521	N-H sallanma, Amid ve Amin
Kitosan	
3318	N-H gerilme ve O-H gerilme
2885	C-H gerilme
1629'daki omuz	Amid I, C=O gerilme
1533	Amid II, N-H bükülme
1396	OH titreşimleri
1154 ve 890	Glikosidik bağlar
1070 ve 1017	C-O gerilme
Hidroksiapatit	
1017	$\nu_3 (\text{PO}_4^{3-})$ gerilme
962	$\nu_1 (\text{PO}_4^{3-})$ gerilme
595	$\nu_4 (\text{PO}_4^{3-})$ gerilme
468	$\nu_2 (\text{PO}_4^{3-})$ gerilme

Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerinin gözenekli yapıya sahip yüzey morfolojileri Şekil 4.25'te SEM görüntüleri ile verilmiştir. Yapı iskelesi içindeki gözenekler donma sırasında oluşan buz kristallerinden kaynaklanmaktadır. Bu durum yapı iskelelerinin ara boşluklar içine yığılmasına ve Şekil 4.25.a'da gösterildiği gibi birbirine bağlı gözenekli bir ağ oluşturmasına neden olmaktadır. Daha sonra buz kristallerinin liyofilizasyonla süblimleştirilmesi buz kristallerinin kapladığı boşlukları gözeneklere dönüştürmektedir.

Üretilen yapı iskelelerinin 20 µm-350 µm arasında değişen bir dizi gözenek boyutuna sahip olduğu gözlemlenmiş ve özellikle Col/fMWCNT/CS iskelesinde fMWCNT ilavesiyle düzenliliğin arttığı belirlenmiştir. Saf Col'den üretilen iskeleler, kompozit iskelelere (Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS) kıyasla daha büyük bir gözenek boyutuna sahiptir.

Biyomineralizasyondan önce 20-350 µm arasında değişen bir gözenek büyüklüğüne sahip üretilen yapı iskeleleri yüksek derecede ara bağlantı ve homojen olarak iyi dağıtılmış açık gözenekli mikroyapıdadır. Doğal kemik dokusundaki ECM taklidinde yaygın olarak kullanılan SBF'nin osteoindüktif substratlar üzerinde kemik benzeri HA'ı çekirdeklendirebildiği bilinmektedir [246]. Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerinin mineralizasyonu 37°C'de fizyolojik koşullar altında SBF içerisinde bir hafta boyunca gerçekleştirilmiştir. Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerinin bir hafta boyunca SBF içine daldırılmasının ardından morfolojik özellikleri Şekil 4.25.b'de gösterilmiştir ve HA'nın tüm kompozit iskele matrislerinde başarıyla çekirdeklendiği açıkça görülmektedir.

Kompozit iskeleler üzerinde HA kristallerinin oluşturulmasına ek olarak iskele matrisi içine gömülmüş büyük HA kristalleri gözlemlenmiştir. Biyomineralizasyon işleminden sonra HA çekirdeklenmesi COO^- ve OH^- gibi anyonik gruplar tarafından tetiklenmekte ve ayrıca azot atomunun bağlanmamış iki elektronu HA çekirdeklenmesi için bir nükleofil görevi görmekteyken CS'nin katyonik ($-\text{NH}_2^+$) doğası da çekirdeklenmeyi tetiklemektedir [247].

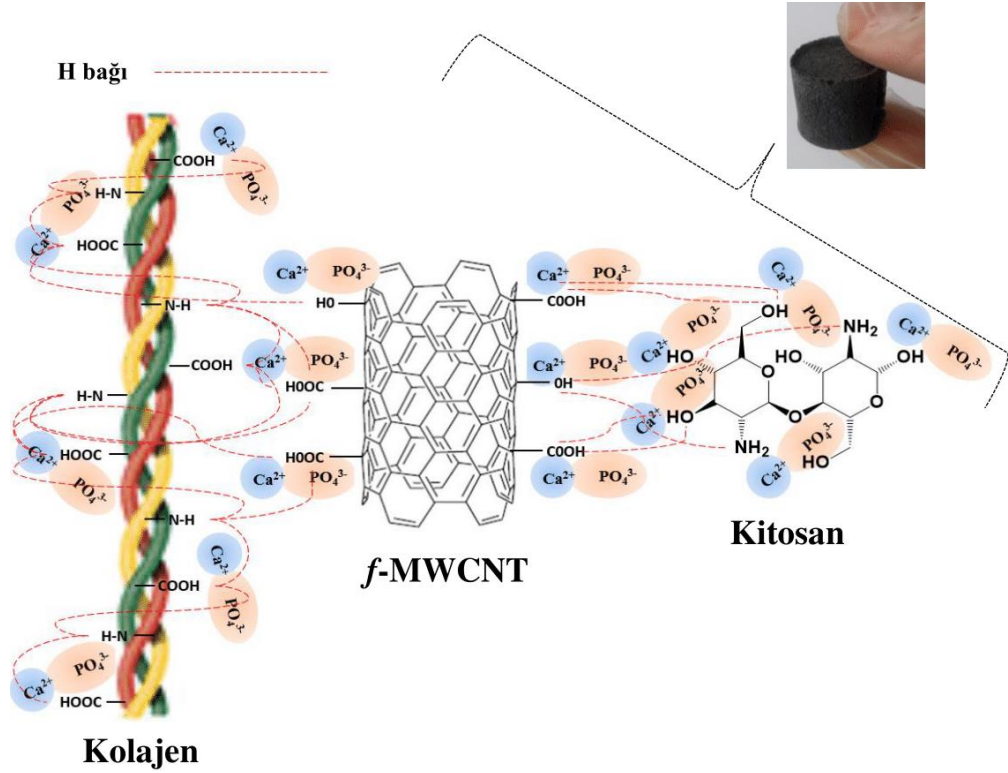


Şekil 4.25. Col, CS, Col/f-MWCNT ve Col/f-MWCNT/CS iskelelerinin (a) biyomineralizasyondan önce $\times 50$ ve (b) sonra $\times 1000$ SEM görüntüleri.

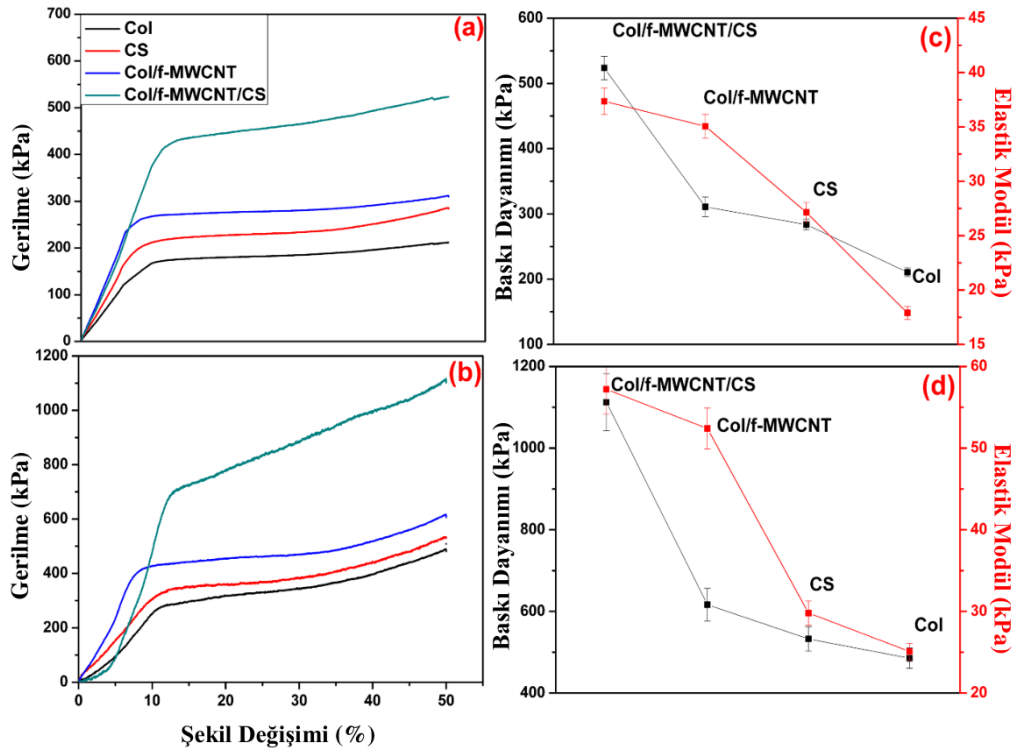
Biyomineralizasyon sonrası SEM görüntülerine bakıldığında tüm iskele yüzeylerinin HA kristal çekirdeklenmesini mümkün kıldığı ve aynı zamanda HA kristalleri çekirdeklenmesinin Col/fMWCNT/CS kompozitinde diğer kompozitlerden kalitatif olarak daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Col/fMWCNT/CS nanohidratları kalsiyum ve fosfat iyonları için bağlanma alanları sağlayan ve HA mineralleşmesine yol açan çeşitli negatif ve pozitif yüklü gruplar içerdiğinden dolayı Col/fMWCNT/CS matrisinin yüklü elektriksel doğasının HA'nın homojen olarak dağılmasında olumlu etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Bu geliştirilmiş biyoaktivitesinin artırılmış nanoyapılı karakteri ile birleştiğinde Col/fMWCNT/CS iskeleleri diğer iskelelerden daha gelişmiş özelliklere sahip olmaktadır.

Kalsiyum ile fosfat molar oranı (Ca/P) EDS analizi ile tespit edilmiş ve Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskeleleri için Ca/P oranları doğal kemikte bulunan HA'nın (Ca/P=1,6) oranına yakın olan sırasıyla 1,34; 1,38; 1,42 ve 1,52 oranları bulunmuştur. EDS sonuçları sitokiyometrik HA'ya en yakın Ca/P oranının Col, CS ve Col/fMWCNT yapı iskeleleri yerine Col/fMWCNT/CS yapı iskelesinde olduğunu kanıtlamaktadır. -C=O, -COO veya -OH grupları HA çekirdeklenmesinde iyon kompleksleri oluşturmak amacıyla kalsiyum iyonlarının koordinasyonu için aktif yerler olabileceklerinden dolayı Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS kompozit iskeleler ile HA arasında oldukça fazla karşılıklı kimyasal etki muhtemeldir. Col yapısında bulunan -OH, -NH₂ ve -C=O grupları hem CS'deki -NH₂ ve -OH hem de fMWCNT'deki -C=O ve -OH ile hidrojen bağı oluşturabileceklerinden dolayı (Şekil 4.26.) biyomineralize olmuş çok sayıda -OH grubunu içinde barındıran Col/fMWCNT/CS kompozit iskelesinde güçlü moleküller arası hidrojen bağları bulunmaktadır.

Şekil 4.27.a ve c'de gösterildiği gibi saf Col (210,7±7 kPa) ve CS (283,8±8 kPa) ile kıyaslandığında biyomineralizasyon öncesi gözenekli nanokompozit yapı iskelelerinin mukavemeti fMWCNT ilavesi ile önemli ölçüde artmaktadır (Col/fMWCNT için 310,9±15 kPa, Col/fMWCNT/CS için 523,6±18 kPa). Col'e kıyasla ağırlıkça %4 fMWCNT ve CS içeren yapı iskelesinde mekanik mukavemeti saf Col'e göre yaklaşık iki katına çıkmıştır.



Şekil 4.26. Biyomimetik yöntemle kalsiyum ve fosfat çekirdeklenmesi ve 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS iskeleleri arasında önerilen hidrojen bağları.



Şekil 4.27. Üretilen yapı iskelelerinin (a), (c) biyomineralizasyon öncesi ve (b), (d) biyomineralizasyon sonrası basma gerilimi ve elastik modül sonuçları.

Biyomineralizasyon ve çapraz bağlanma sonrası Şekil 4.27.b ve d’de gösterildiği gibi kompozit yapı iskelesinin mukavemeti HA ile artmıştır (Col için $485,4 \pm 25$ kPa, CS için $532,8 \pm 30$ kPa, Col/fMWCNT için $616,5 \pm 40$ kPa, Col/fMWCNT/CS için $1112,2 \pm 70$). Elde edilen mukavemet değerleri Tablo 4.5.’de özetlenmiştir.

Tablo 4.5. Biyomineralizasyon öncesi ve sonrası 3B gözenekli Col, Cs, Col/fMWCNT, Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerinin mekanik özellikleri.

	Çapraz Bağlı Yapı İskelesi	Elastik Modül (kPa)	Basma Dayanımı (kPa)
Biyomineralizasyon Öncesi	Col	$17,9 \pm 0,6$	$210,7 \pm 70$
	CS	$27,1 \pm 0,9$	$283,8 \pm 80$
	Col/fMWCNT	$35,1 \pm 1,1$	$310,9 \pm 15$
	Col/fMWCNT/CS	$37,4 \pm 1,2$	$523,6 \pm 18$
Biyomineralizasyon Sonrası	Col	$25,1 \pm 1,0$	$485,4 \pm 25$
	CS	$29,8 \pm 1,5$	$532,8 \pm 30$
	Col/fMWCNT	$52,4 \pm 2,5$	$616,5 \pm 40$
	Col/fMWCNT/CS	$57,2 \pm 3,0$	$1112,2 \pm 70$

\pm SD, n =5

Kemik doku mühendisliği alanı için uygulanan kemik dokusunun yenilenmesi sırasında yapısal birliğini koruması için kararlı olması gereken yapı iskelelerinin mekanik özelliği kemik iskele materyallerinin seçimi için çok önemlidir. HA’nın biyomineralizasyon yoluyla eklenmesi sonucu mekanik mukavemet artışının muhtemel nedenleri ya kompozit iskelesindeki kusurların azalması ya da fMWCNT, CS ve HA ilaveleri ile Col’ün toplam bağlanma yerindeki artış olduğu düşünülmektedir.

HA kristallerinin biyomineralizasyonla iskelelere katılması mekanik modülü güçlendirmiş ve yapı iskelesi ağının deformasyonu kısıtlamıştır. Mekanik özellik sonuçlarına dayanarak biyolojik kompozit iskelelerimiz yüksek basınç dayanımına ulaşmamasına rağmen yük taşıyan kemik yerine geçecek uygulamalardan ziyade yük taşımayan kemik doku mühendisliği alanı için iskele olarak kullanılabilir özelliktedir.

Yapı iskelelerinin porozite oranları sıvı yer değiştirme yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Biyomineralizasyon öncesi Col (%99,5±0,28), Cs (%99,3±0,25), Col/fMWCNT (%99 ±%0,26) ve Col/fMWCNT/CS (%98±0,15) yapı iskelelerinin gözenekliliklerinin (şekil 4.28.a) biyomineralizasyon sonrası Col (%96,2±0,25), Cs (%96±0,22), Col/fMWCNT (%95,8±0,21) ve Col/fMWCNT/CS (%95,7±0,1) yapı iskelelerinin gözenekliliklerine (şekil 4.28.b) göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Yüksek gözeneklilik oranı in-vivo ve in-vitro kemik yenilenmesinde çok önemli bir rol oynadığı için porozite kemik doku mühendisliğinde kullanılan yapı iskelelerinin önemli bir özelliğidir. Yüksek gözeneklilik oksijen ve besinlerin daha iyi taşınmasını sağlayarak hücre çoğalma seviyelerini arttırır ve bu da yeni kemik oluşumu ile sonuçlanır [248]. Biyomineralizasyon öncesi yapı iskelelerine kıyasla biyoyumluluk ve mekanik özellikler artar iken aynı zamanda %95 porozite hedefimize de ulaşılmıştır. Biyomineralizasyon sonrası iskelelerde (şekil 4.28.b) Col ve CS'nin NH₂ grubu ile fMWCNT ve HA'nın -OH grubu arasında oluşabilecek etkileşimler ve HA'nın Ca²⁺ iyonları ile koordinasyon etkileşimleri poroziteyi azaltabilir. Üretilmiş olan yapı iskelelerinde elde edilen yüksek gözeneklilik ve geliştirilmiş geçirgenlik ile birlikte gelişmiş mekanik özellikler implantasyon sonrası vaskülarizasyonu ve hücre içe büyümesini desteklemek için ideal bir yapı iskelesi olmasını sağlar.

Biyomalzemelerde araştırılan bir diğer özellik sıvı ortamdaki kararlılıktır. şişme derecesi yapı iskelesinin stabilitesi ile birlikte iskele ve sıvı hücreler arasındaki karşılıklı etki derecesini belirlediğinden dolayı kemik dokusu yenilenmesi için önemli bir özelliktir. Örneğın yüksek derecede şişme ve uzun süreli stabiliteye sahip bir malzeme varsa hücreler ve biyomalzeme arasında gelişmiş bir karşılıklı etki beklenir ve sonuç olarak yeni dokunun büyüme şansını arttırır. Ayrıca ideal olarak belirli bir zaman aralığından sonra biyomalzemeler bozulur ve vücuda geri emilir. Yapı iskeleleri kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere sentezlenmiştir ve bu alanda yapı iskelelerinin şişmesi ve biyobozunma özellikleri fizyolojik sıvıların emilimi ve metabolitler ile besin maddelerinin yapı iskelelerinden geçmesi için önemlidir.

Şekil 4.28.c, d’de gösterilmiş olan yapı iskelelerinin şişme oranları ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir (n=5). Aşırı şişme oranlarından kaçınmak için yapı iskeleleri [116]’da gösterildiği gibi DHT yöntemi ile 120°C’de 48 saat süreyle vakum altında çapraz bağlanmıştır. Biyomineralizasyon öncesi Col, CS, Col/fMWCNT, Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerinin şişme sonuçları sırasıyla %680 \pm 27, %613 \pm 25, %551 \pm 25, %514 \pm 24 olarak bulunmuştur.

Biyomineralizasyon işleminden sonra, bu yapı iskelelerinin şişme sonuçları sırasıyla şu şekilde azalmıştır 613 \pm 27, 565 \pm 25, 526 \pm 26 ve 481 \pm 25. Yapı iskelelerine biyomineralizasyon ile HA eklenmesinin şişmeyi güçlü bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir. Kompozit yapı iskelelerin biyomineralizasyonu öncesi ve sonrasındaki şişme değerlerinin karşılaştırması Şekil 4.28.c, d’de gösterilmiştir ve Col/fMWCNT/CS yapı iskelesinin implantasyondan sonra daha düşük bir biyobozunma ve daha uzun kalma süresine sahip olması beklenmektedir.

Şişme verilerinin (Şekil 4.28.c, d) %100’den daha yüksek olması iskelelerin kendi ağırlığından daha fazla su tutma kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir. fMWCNT’nin hidrofobik karakterinin eklenmesi biyomineralizasyondan önce şişmenin azaltılmasına kısmen etkimiş olabilir. Nanokompozit iskele üzerindeki interaktif yüzey alanının azaltılması ile şişme ve su geçirgenliği azalacaktır. Bu azalmaya HA’nın ihmal edilebilir miktarda su emmesinde katkısı olduğu düşünülmektedir. Yapı iskelesinin su geçirgenliği içerdiği HA artmasıyla düşmüştür. Biyomineralizasyondan önce ve sonra olan bu iki çalışmanın sonuçları HA’nın dâhil edilmesinin yapı iskelesinin hidrofilik özelliklerini azalttığını göstermiştir.

TGA eğrileri biyomineralize Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS kompozit iskelelerin termal bozunma davranışını göstermektedir. Şekil 4.28.e’ye bakıldığında, iskeleler termal olarak kararlı değildir ve 100°C civarında adsorbe edilen suyun çıkarılmasından kaynaklanan ağırlık kaybı gözlenmektedir.

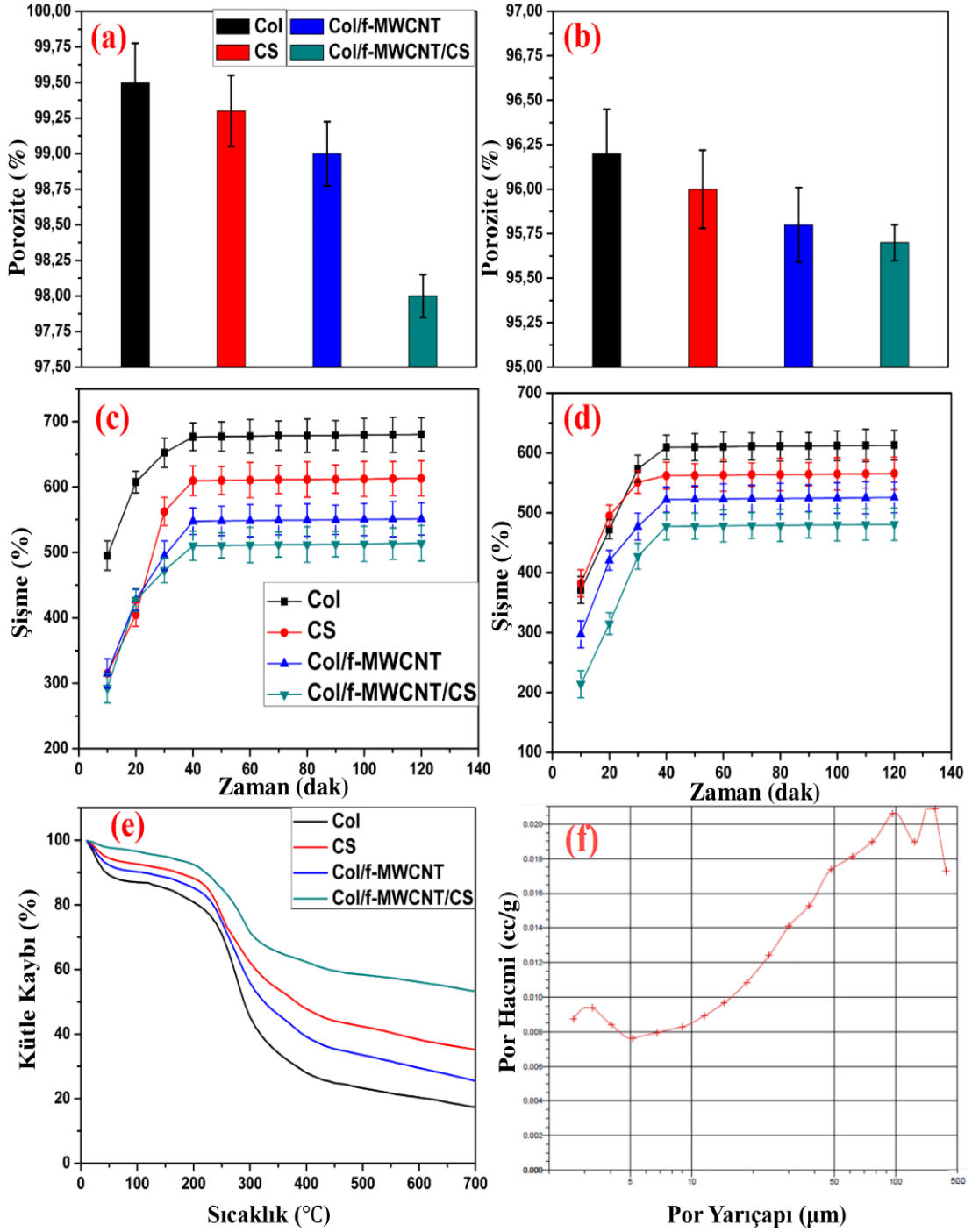
Üretilmiş kompozit iskelelerde organik bileşenin termal ayrışması çoğunlukla 250-400°C aralığında gerçekleşmiştir [249]. Organik bileşenlerin 400°C’de tamamen

ayrıldığı kabul edilmiştir. HA ve fMWCNT bileşikleri Col ve CS'den termal olarak daha kararlı oldukları için HA çekirdeklenmesi ve fMWCNT (Col'ün %4 ağı.) ilavesinin kütle kaybını azalttığı görülmüştür.

Yapı iskelelerinin termal davranışları Şekil 4.28.e'de görüleceği gibi üçe ayrılmış kütle kaybı evresi ile karakterize edilmiştir. Birincisi yaklaşık 100°C'de olup kompozit yapı iskelelerindeki suyun serbest bırakılması ile ilgilidir; ikincisi 250-400°C civarındadır ve hem Col hem de CS (Col %4 ağı.) moleküllerindeki polimer yapı zincirlerin termal dehidrasyonu, depolimerizasyonu ve ayrışmasından kaynaklanır; üçüncüsü 400–700°C aralığında meydana gelmektedir ve organik bileşenlerin yanması ile ilişkilidir.

Col ve CS iskeleleri ile karşılaştırıldığında termal bozunma sıcaklığındaki küçük değişiklik Col, CS ve fMWCNT arasında olası bir etkileşimi gösterirken 700°C'de olan son % kütle kaybındaki azalma (Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskeleleri için sırasıyla %18, %28, %35 ve %54 olarak bulunmuştur) HA çekirdeklenmesinin arttığını göstermektedir. Elde edilen bu sonuç üretilen 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS iskelelerinin biyoaktivitesinin Col, CS ve Col/fMWCNT iskelelerine kıyasla daha iyi olduğunu desteklemektedir.

Col/fMWCNT/CS iskelesinin N₂ adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi Şekil 4.28.f'de gösterilmiştir. Spesifik yüzey alanı ve gözenek hacmi sırasıyla BET ve BJH yöntemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi'nin iki koluna bakıldığında P/P₀ bölgesinde olan 0,9-1,00 arası keskin bir adsorpsiyon aşamasının varlığı ve 0,8'den daha büyük olan P/P₀ kısmi basıncındaki histerisis poroz malzemenin iyi hazırlandığını ve düzenli olduğunu göstermektedir. Yapı iskelesi yüzeyinin artması ile hücre büyümesinin arttığı bilindiğinden [250] Col/fMWCNT/CS yapı iskelesinin yüksek yüzey alanına (11,746m²/g) ve iyi bir gözenek hacmine (0,026 cc/g) sahip olduğunun bulunması hücre büyümesine olumlu bir etkiye sahip olacağını göstermiştir.



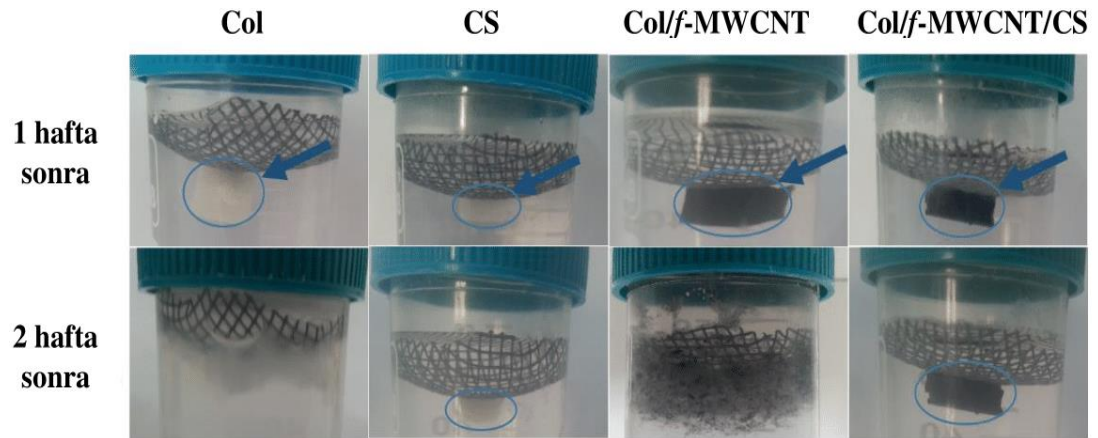
Şekil 4.28. Üretilen kompozit numunelerinin (a) biyomineralizasyon öncesi (b) biyomineralizasyon sonrası porozite, (c) biyomineralizasyon öncesi (d) biyomineralizasyon sonrası şişme, (e) biyomineralizasyon sonrası TGA eğrileri ve (f) Col/fMWCNT/CS kompozit iskelesinin BET analizi.

Şekil 4.29. üretilen iskelelerin (Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS) 37°C'de çalkalayıcıda bir ve iki hafta boyunca PBS içerisine daldırılmaları sonrası fotoğraflarını göstermektedir. CS ve Col/fMWCNT/CS kompozitleri 2 haftaya kadar stabil kalırken, Col iskeleti PBS'nin içerisinde bozularak dağıldığından fotoğrafta

görülememektedir. 2 haftadan sonra bütünlüğünü yitirmiş olan Col ve Col/fMWCNT kompozitleri için iki hafta boyunca dikkate değer değişiklikler gözlemlenmiştir.

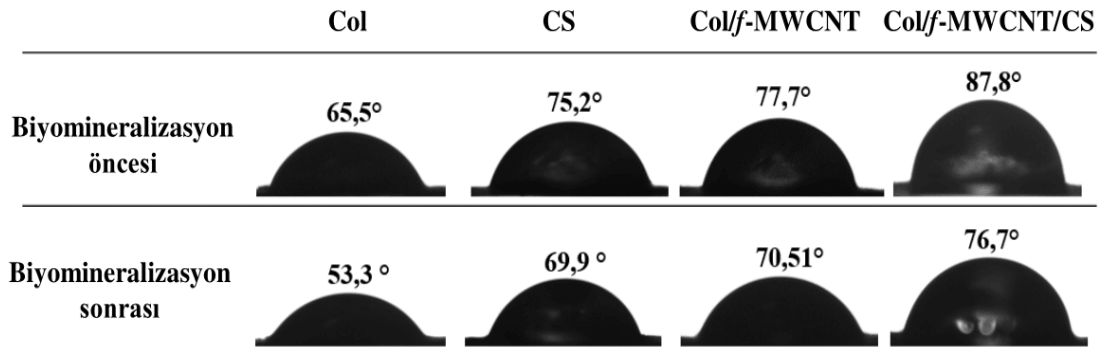
Col/fMWCNT yapı iskelesi için suyun iskelelerde dağıldığı ve Col/fMWCNT arasındaki bağı kırdığı böylece iki hafta sonra uzun Col'den kısa Col zincirine geçerek biyobozunmayı arttırdığı kabul edilmiştir. PBS'deki yapı iskelelerinin gözlemleri CS ve fMWCNT oranlarının değiştirilmesi ile yapı iskelesi matrisinin stabilite derecesinin ayarlanmasının mümkün olduğunu göstermektedir.

Yapı iskelesi biyobozunma oranının yeni kemik dokusu oluşumuna izin verecek şekilde olması önemlidir. Böylece kemik doku mühendisliğinde kemik yenilenmesi için daha uzun veya daha kısa sürelerin gerekli olduğu çeşitli uygulamalar için kompozit iskelenin yapılandırılması mümkündür.



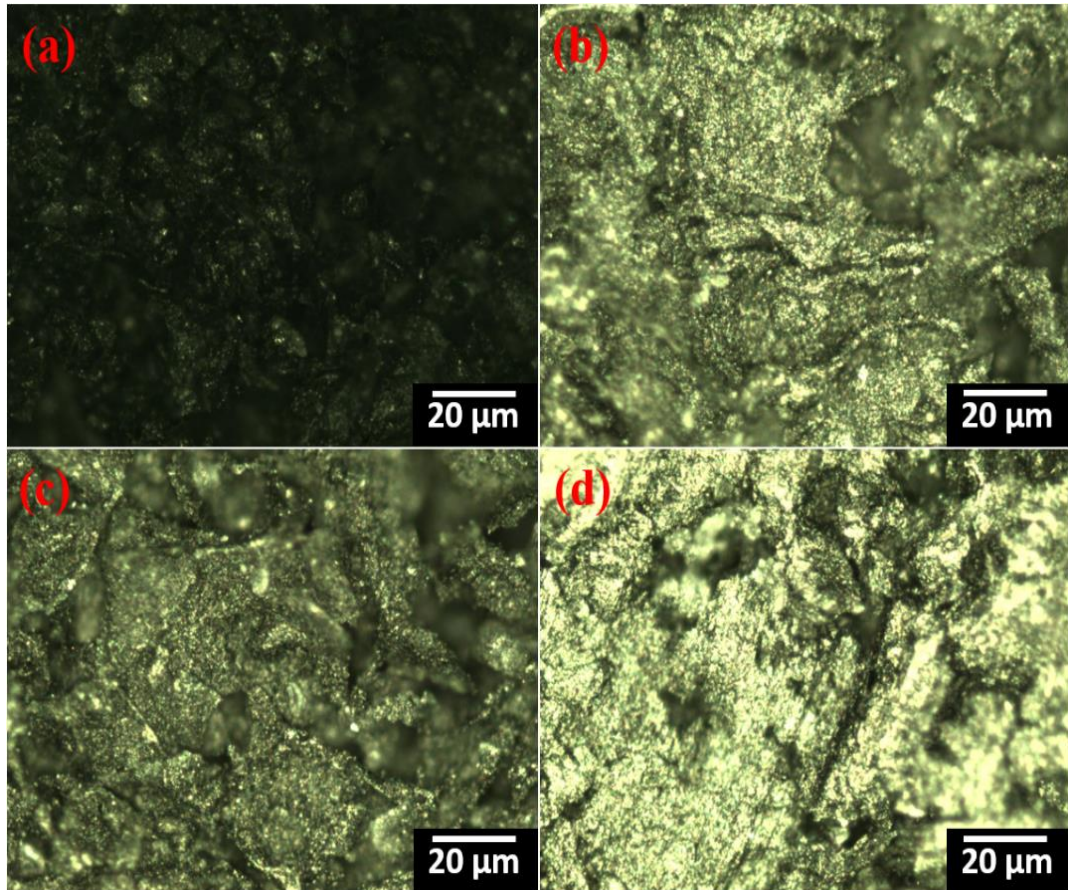
Şekil 4.29. 1 ve 2 hafta sonra Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskelelerinin biyobozunma deneyi.

fMWCNT, CS ve HA yapı iskelelerinin hidrofilité üzerindeki etkisini gözlemlemek için temas açıları belirlenmiş ve kompozit iskeleler biyomineralizasyon öncesinde ve sonrasında karşılaştırılmıştır. Şekil 4.30.'dan görülebileceği gibi CS ve fMWCNT'nin eklenmesi hidrofilité grupların azaltılması sonucu temas açılarını arttırmaktadır. Kısmen hidrofilité olan HA'nın biyomineralizasyonu ile temas açısının azaldığı görülmüştür. Bu azalma implantasyon bölgesinde vücut sıvıları ile etkileşimini arttırdığı için in-vivo ortamda olumlu bir etkiye sahiptir.



Şekil 4.30. Biyomineralizasyon öncesi ve sonrası üretilen iskelelerinin temas açıları.

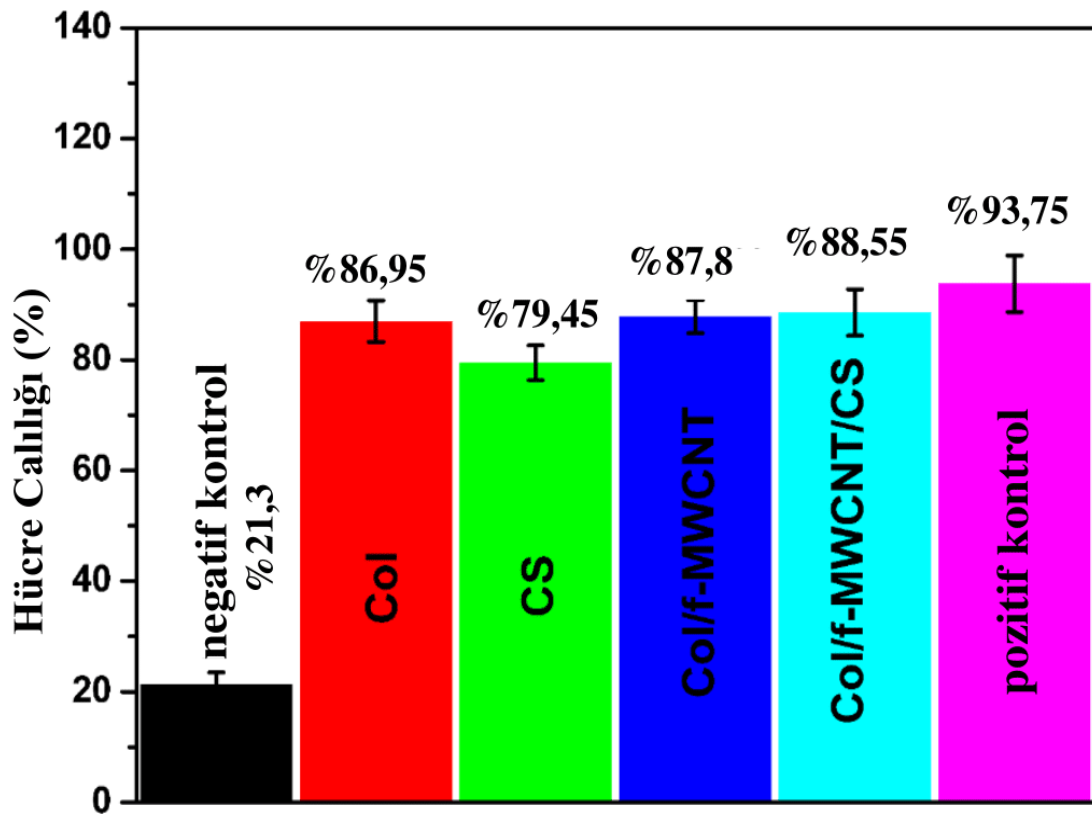
HA optik mikroskobun gelen ışığını yansıttığı için Şekil 4.31.'de gösterildiği gibi HA partiküllerin dağılımı ayrıca optik mikroskop ile değerlendirilmiştir. Böylece HA'ların bütün yapı iskelesi içinde hafif agregasyon ile homojen olarak yayıldığı ve bu optik mikroskop sonuçlarının SEM sonuçları ile uyum içinde olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Üretilen 3B (a) Col, (b) CS, (c) Col/fMWCNT ve (d) Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerin optik mikroskop görüntüleri.

Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerinin sitotoksitesini MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.32.'de gösterildiği gibi yapı iskelelerinin hücre canlılıkları arasında önemli bir fark yoktur. CS yapı iskelesi pozitif kontrol grubuna kıyasla hücre yaşayabilirliğini belirli bir dereceye kadar azaltan sitotoksite sergilemiştir. Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerinin tüm MTT analiz sürecinde en uygun biyoyumluluğu sergilediği görülmüştür.

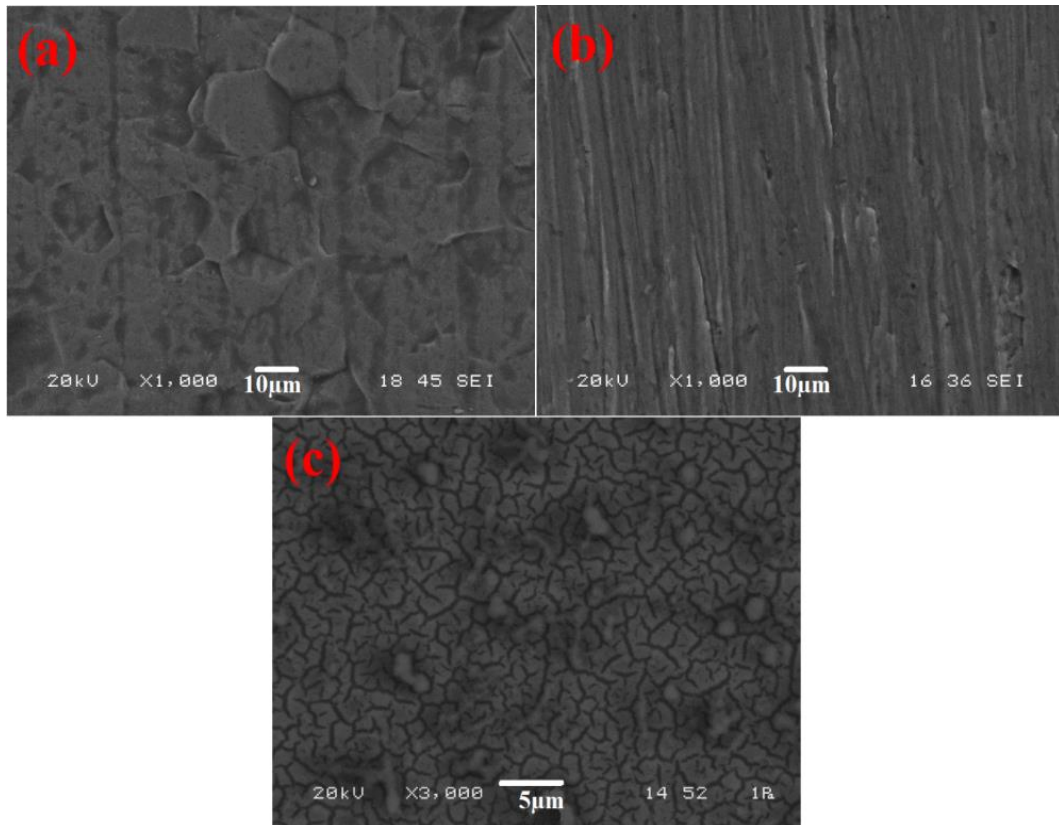
MTT testi ile [123, 181, 251–254]'de belirtildiği gibi fMWCNT ve CS üzerindeki hücrelerin canlılıklarının arttığı gözlemlenmiştir. Böylelikle Col/fMWCNT/CS yapı iskeleleri biyomineralizasyon kabiliyetinin ve biyoyumluluğun geliştirilmesinden dolayı in-vivo biyomedikal uygulamalarda kullanılmak için ümit vaat ettiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.32. MTT analizi ile Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskelelerinin in-vitro biyoyumluluğu ve hücre çoğalması. Ortalama \pm SD (n = 3).

4.5. Yeni m-5xSBF’de Monofazik Brushitin Ti6Al4V Üzerine Biyomimetik Yöntemle Kaplaması Çalışması

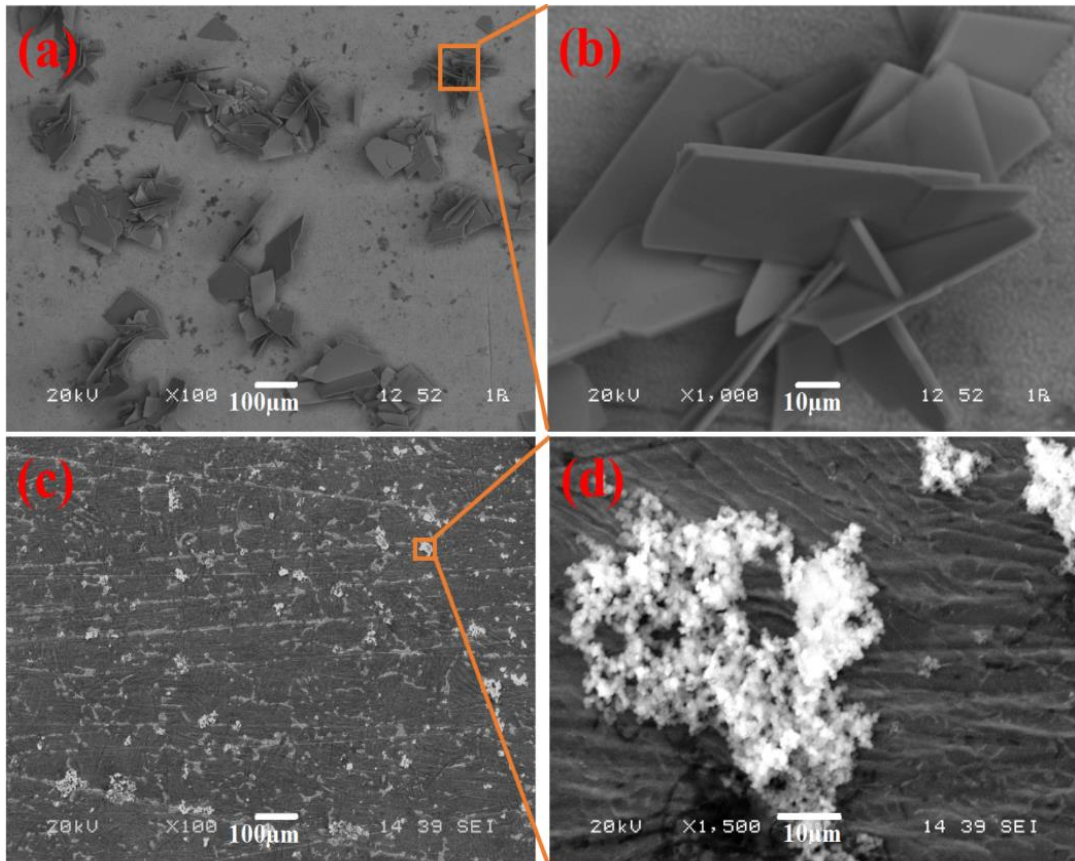
Şekil 4.33., (a) işlem görmemiş, (b) pürüzlendirilmiş ve (c) 60°C’de 24 saat boyunca 5M NaOH çözeltisi ile etcing işlemi sonrasındaki Ti6Al4V substrat yüzeylerinin SEM görüntülerini göstermektedir. Yüzey morfolojisinin pürüzlendirme ve etcing işlemleri ile değiştiği açıkça görülmektedir. Bu değişikliğin sadece kalsiyum-fosfat iyonlarının çekirdeklenme oranını arttırmakla kalmayıp, aynı zamanda yüzeydeki kalsiyum ve fosfat iyonlarının adezyon kuvvetlerini güçlendirdiği de bilinmektedir [255].



Şekil 4.33. (a) işlem görmemiş, (b) pürüzlendirilmiş ve (c) 24 saat 60°C’de 5M NaOH çözeltisi ile etcing sonrasındaki Ti6Al4V plakalarının SEM görüntüleri.

1 gün boyunca m-5xSBF ve 5xSBF içine daldırmanın ardından Ti6Al4V üzerindeki CaP çekirdekli yüzey morfolojileri sırasıyla Şekil 4.34. (a, b) ve (c, d)’de gösterilmiştir. m-5xSBF ve 5xSBF’de meydana gelen çekirdeklenmelerin farklı morfolojilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, diğer küçük çekirdekler Şekil 4.34.a ve c’de gösterilmiştir. Şekil 4.34. (a, b)’de elde edilen çekirdeklenmelerde

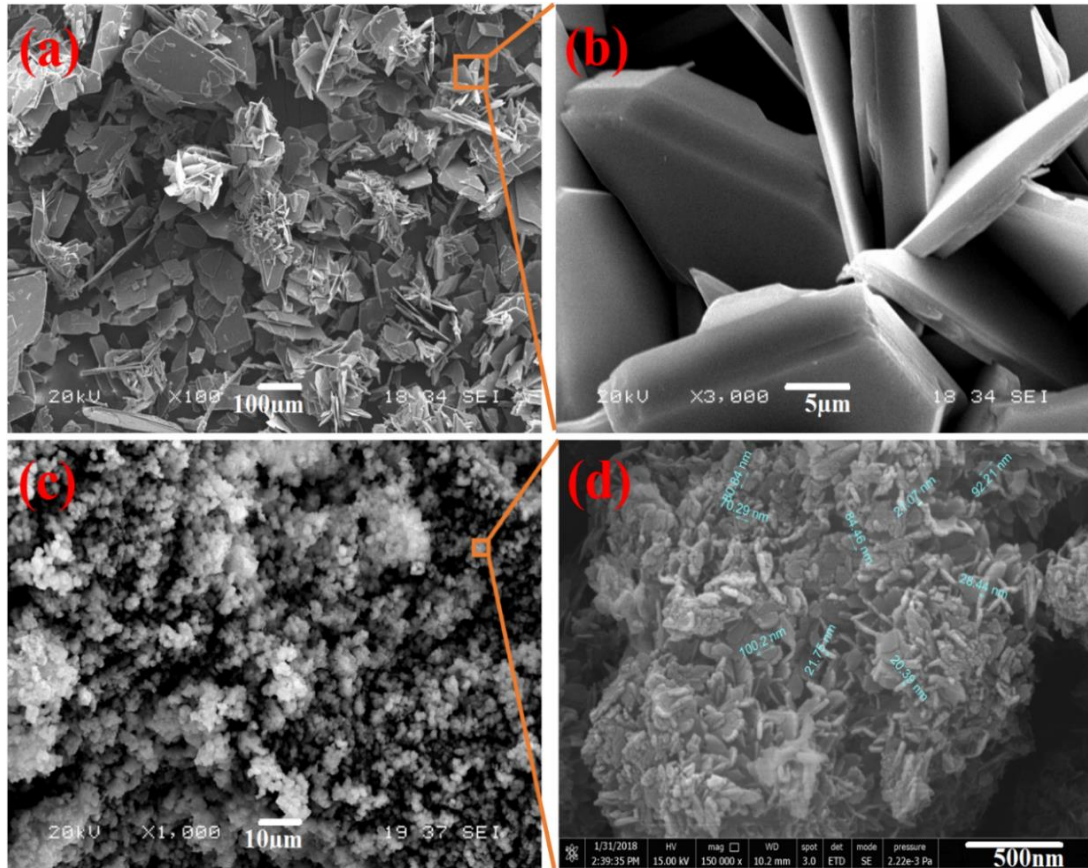
plakaların birbiri içerisine girdiği görülmektedir. Bu çiçek benzeri iç içe geçmenin nedeni yüzey enerjisinin daha kararlı hale gelmesi olduğu düşünülmektedir. Şekil 4.34.'den sadece Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyon konsantrasyonlarının (5xSBF'den m-5xSBF'ye) artmasının, 5xSBF'ye kıyasla Ca^{2+} ve PO_4^{3-} dışındaki iyonların iyonik etkisinde azalma ile Ca^{2+} ve PO_4^{3-} çekirdeklenmesinin artmasına neden olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.34. İlk gün sonunda (a, b) m-5xSBF ve (c, d) 5xSBF içerisinde CaP ile çekirdeklenmiş Ti6Al4V yüzeylerinin SEM görüntüleri.

Şekil 4.35.a ve c'deki SEM görüntülerinden Ti6Al4V plakalarının sırasıyla m-5xSBF ve 5xSBF'de 2 gün daldırılmalarının ardından tamamen kaplandığını göstermektedir. Şekil 4.35.b'deki SEM görüntüsünden ve Şekil 4.35.d'deki FESEM görüntüsünden kaplanmış olan iki ayrı CaP fazının da plaka benzeri morfolojide aglomerasyona sahip olduğu görülmüştür. m-5xSBF'den elde edilen yapılar mikro boyutlarda iken (kalınlık ve genişlik sırasıyla yaklaşık 5-6 μm ve 50-150 μm aralığında) 5xSBF'den elde edilen yapılar ise nano boyutlardadır (kalınlık ve genişlik sırasıyla yaklaşık 20-28 nm ve 70-

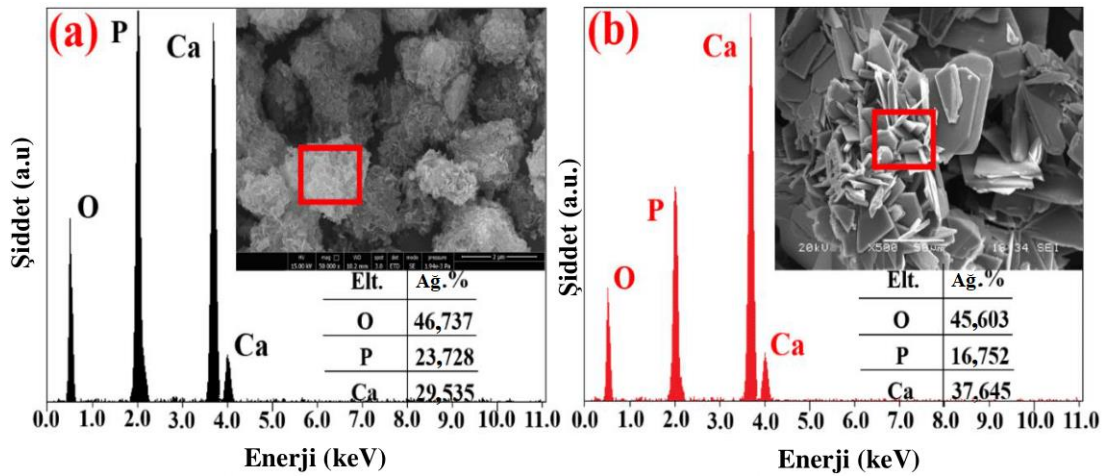
100 nm aralığında). m-5xSBF çözeltisindeki iyonik gücün 5xSBF çözeltisine kıyasla daha az olduğundan dolayı yüzeyde elde edilen CaP yapılarının kristal boyutu kalsiyum-fosfat iyon konsantrasyonlarının ve iyonik kuvvetin etkisiyle değiştiği söylenebilir. İyonik difüzyon düşük iyonik kuvvetle geliştirilir ve böylece artan bu etkinin kristal boyutlarındaki farklılığa da etki ettiği düşünülmektedir.



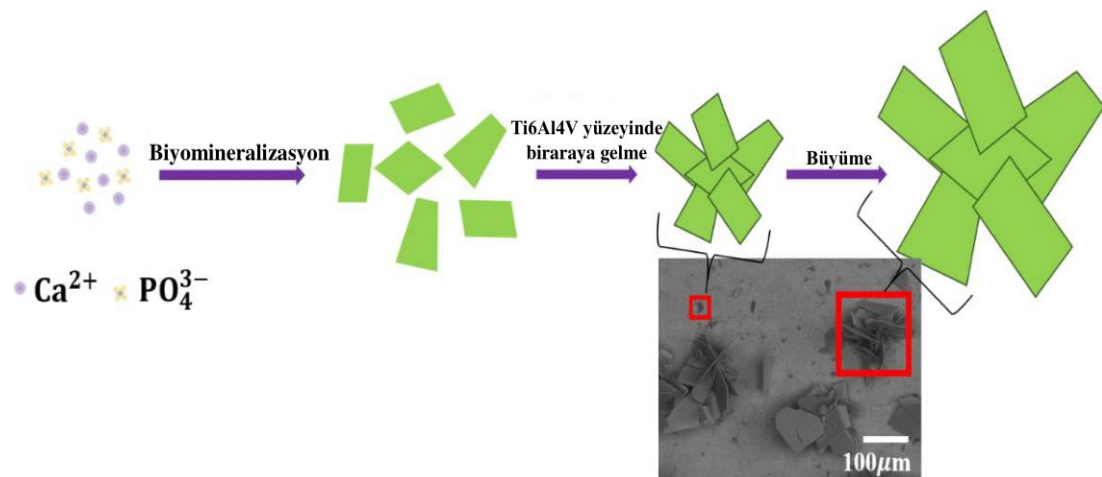
Şekil 4.35. 2 gün sonra (a, b) m-5xSBF ve (c, d) 5xSBF içinde CaP ile kaplanmış Ti6Al4V'nin (a, b, c) SEM ve (d) FESEM görüntüsü.

Şekil 4.36., kaplamalar üzerinde gerçekleştirilen EDS analizini göstermektedir ve şekil üzerinde tablo halinde verilmiş olan % element analiz sonuçları kaplamaların O, P ve Ca elementlerinden oluştuğunu göstermektedir. Tablodan görülebileceği gibi, 2 gün sonra m-5xSBF ve 5xSBF içinde kaplanmış sodyum veya klor safsızlıkları içermeyen CaP fazlarına ait Ca/P atomik oranları sırasıyla 0,97 ve 1,72 idi. Bu oranlar brushit ve HA için sırasıyla 1,0 ve 1,67 olan Ca/P atomik oranlarına yakındır.

Ti6Al4V üzerinde kaplanan plaka benzeri CaP'ların oluşum sürecini açıklayan olası bir mekanizma Şekil 4.37.'de önerilmiştir. Ti6Al4V substratlar biyomimetik solüsyona daldırıldığında ilk daldırma sürelerinden itibaren CaP yapılarının şu sırayla oluşmaya başlamaktadır: biyomimetik koşullar altında kimyasal reaksiyon, çekirdeklenme ve kristal büyümesi. İlk oluşturulan nanoplakaların yüzey enerjisi çekirdeklenme aşamasından daha yüksek olduğu için nanoplakalar daha büyük plaka yapılarına dönüşerek yüzey enerjilerini azaltmak için spesifik yönelimle kendi kendilerine bir araya geldikleri düşünülmektedir. Böylece, Ti6Al4V üzerinde çiçek benzeri hiyerarşik CaP yapıları inşa edilmiştir.



Şekil 4.36. 2 gün sonunda (a) m-5xSBF ve (b) 5xSBF içinde kaplanmış CaP'ın EDS bölge analizi. Ek: EDS spektrumlarının elde edilmesi için kullanılan bölgelerin görüntüleri (kırmızı çerçeveler).



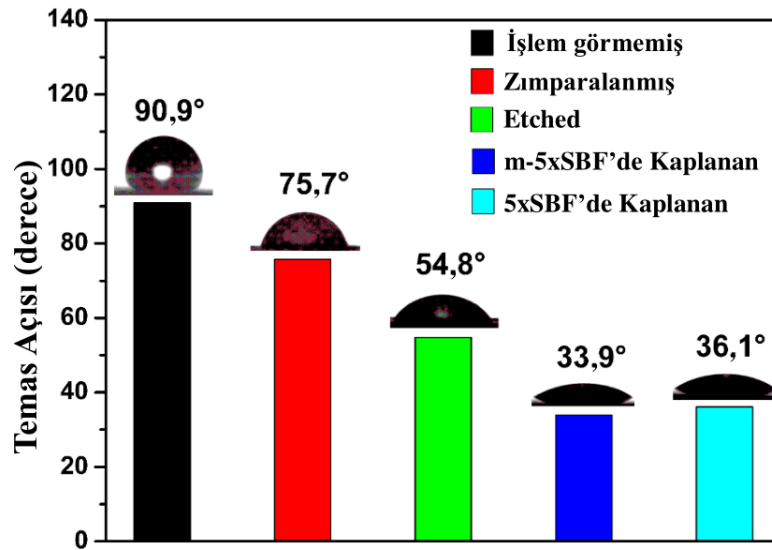
Şekil 4.37. Ti6Al4V üzerinde CaP tabakaları ile bir araya getirilmiş çiçek benzeri hiyerarşik yapıların oluşturulması için şematik gösterim.

Malzemenin yüzey ıslanabilirliği temas açısı ile karakterize edilmiştir ve Şekil 4.38.'da gösterilen ölçüm sonuçlarına bakıldığında işlem görmemiş Ti6Al4V'a ait temas açısı olan 90,9° değeri en yüksek açı değerini göstermektedir. Pürüzlendirme ve 60°C'de 24 saat süreyle 5M NaOH çözeltisi içerisinde etching (aşındırma) işlemi sonrası temas açıları sırasıyla 75,7° ve 54,8°'ye düştüğü görülmüştür. Kaplama birikiminden sonra m-5xSBF ile kaplanan yüzeyin temas açısı değeri 33,9° iken, 5xSBF ile kaplanan yüzeyin 36,1° olarak bulunmuştur.

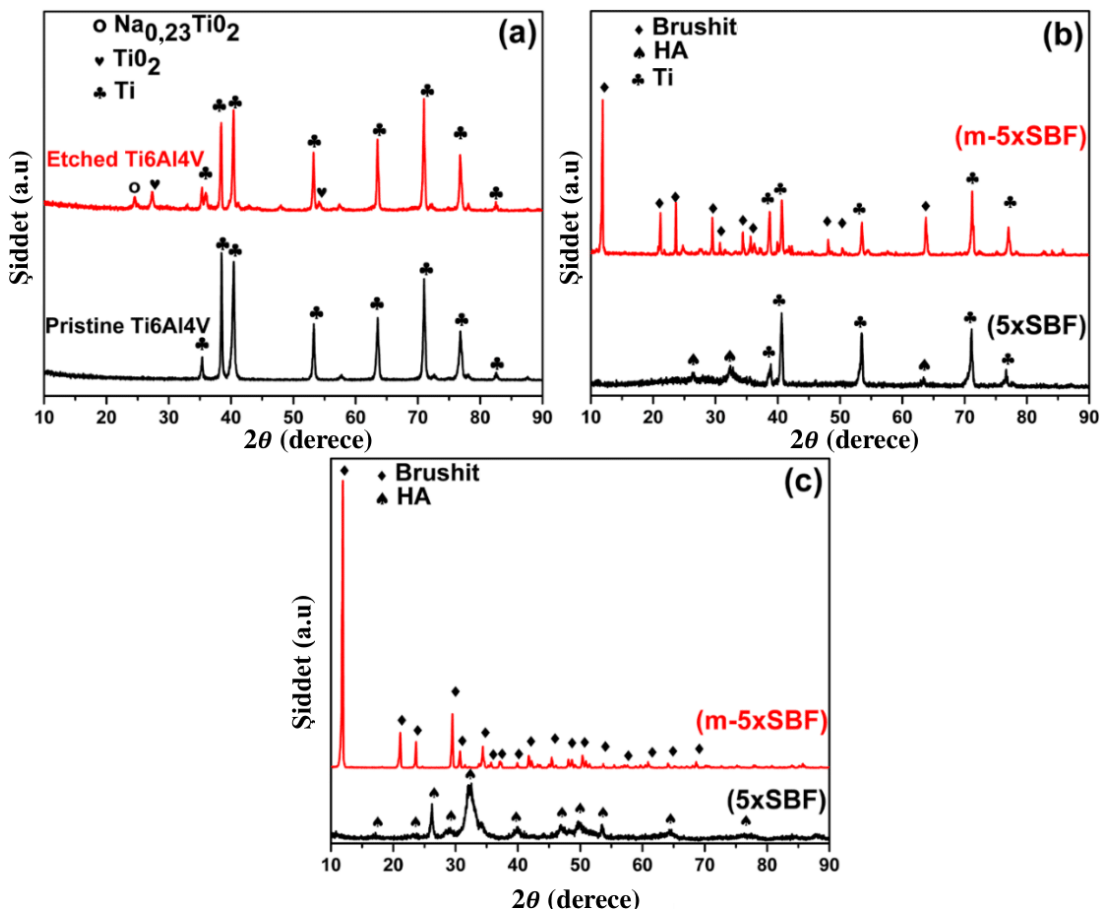
Bir implantın yüzey yükünün ve hidrofiliğinin osseointegrasyonu etkilediği bilinmektedir. Hücre adhesyonunun dayanımı adhezyon ligandlarının adsorbsiyonuna ve absorblanan adhezyon ligandlara bağlı olduğu bilinmektedir, yani hidrofobiklik hücreler ve yüzey arasındaki etkileşimi etkilemektedir [256]. Bundan dolayı m-5xSBF içerisinde kaplanmış numunenin artan hidrofiliği 5xSBF'de kaplanmış olanlara kıyasla osseointegrasyonun artmasını sağlayacaktır.

İşlem görmemiş (Pristine) ve 60°C'de 24 saat boyunca 5M NaOH çözeltisi ile muamele edilmiş (Etched), m-5xSBF ve 5xSBF ile 1 gün sonrasında çekirdeklenmiş ve m-5xSBF ve 5xSBF ile 2 gün boyunca kaplanmış Ti6Al4V substrat yüzeyinin XRD paternleri Şekil 4.39.'da gösterilmektedir. Şekil 4.39.a'dan görülebileceği gibi, alkali ve ısı işlemlerinden sonra yüzey üzerinde sodyum titanatın ($\text{Na}_{0,23}\text{TiO}_2$, ICDD PDF kartı No. 22-1404) ve titanyum dioksit (TiO_2 , ICDD PDF kartı No. 21-1276) fazları oluşturulmuştur. 24,4° ve 27,4° civarında ortaya çıkan pikler sırasıyla $\text{Na}_{0,23}\text{TiO}_2$ ve TiO_2 fazlarının oluşumuna karşılık gelmektedir.

XRD sonuçlarına göre brushit ($\text{CaHPO}_4(\text{H}_2\text{O})_2$, ICDD No. 72-0713) ve HA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, ICDD No. 09-0432) fazları 1 gün sonrasında (Şekil 4.39.b) substrat yüzeyi üzerinde görülmeye başlamıştır. m-5xSBF'de elde edilen monofazik brushit fazı literatürdeki teorik çalışmanın [257] sonucuyla da tutarlılık göstermektedir. Numunelerin 2 gün boyunca hem m-5xSBF hem de 5xSBF'ye daldırılmasının ardından substratların yüzeyinde sadece brushit ve HA fazları görülmüştür (Şekil 4.39.c).



Şekil 4.38. İşlem görmemiş (Pristine), zımparalanmış (Polished), 60°C'de 24 saat boyunca 5M NaOH çözeltisi ile muamele edilmiş (Etched), m-5xSBF ve 5xSBF ile 2 gün sonrasında kaplanmış Ti6Al4V yüzeylerinin temas açıları.



Şekil 4.39. (a) işlem görmemiş (Pristine) ve 60°C'de 24 saat boyunca 5M NaOH çözeltisi ile muamele edilmiş (Etched), (b) m-5xSBF ve 5xSBF ile 1 gün sonrasında çekirdeklenmiş ve (c) m-5xSBF ve 5xSBF ile 2 gün sonrasında kaplanmış Ti6Al4V yüzeylerin XRD paternleri.

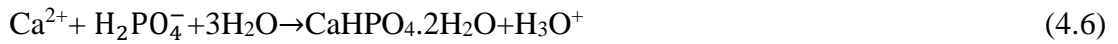
Brushit ve HA fazlarına ait olan S değerleri (4.3), (4.4) ve (4.5) eşitlikleri ile gösterilmiştir:

$$S = \frac{IP}{K_{sp}} \quad (4.3)$$

$$S_{Brushit} = \frac{[Ca^{2+}][HPO_4^{2-}]}{K_{sp,brushit}} \quad (4.4)$$

$$S_{HA} = \frac{[Ca^{2+}]^5[PO_4^{3-}]^3[OH^-]^1}{K_{sp,HA}} \quad (4.5)$$

, burada IP ürünlerin iyon aktivitesi, K_{sp} termodinamik çözünürlük sabitidir. $S < 1$ için çözelti doymamış olduğu için mineral fazı çözünür, $S = 1$ için mineral fazı ve çözelti dengede ve $S > 1$ için çözelti aşırı doymuştur ve mineral faz çekirdeklenecektir. Çözeltideki iyonlardan brushit ve HA fazlarının oluşumu Denklem (4.6) ve (4.7)'daki reaksiyonlar ile verilmiştir.



32°'de merkezlenen difraksiyon piki kristalin HA boyutlarının küçük olmasından dolayı geniştir. Ti'ye ait piklerin yokluğu her iki numune yüzeyinin 2 gün sonunda farklı CaP fazları ile tamamen kaplandığına işaret etmektedir. Sentezlenen fazlara ait XRD verileri kullanılarak hesaplanan kristal yoğunluğu, kristalin boyutu ve kristallenme oranı Tablo 4.6.'da verilmiştir. CaP fazlarının ICDD numaralarına göre HA ve brushit için en güçlü piklerin Miller indeksleri (hkl) sırasıyla (211) ve (020)'dir. Şekil 4.34.a, b ve Şekil 4.35.a, b'den görüleceği gibi plaka benzeri olan brushit morfolojisi (020) kristalografik düzlemi boyunca tercih edilen büyümeden kaynaklanmaktadır [258]. Şekil 4.39.c'den anlaşılacağı gibi brushitin D ve X_c değerleri HA'ninkinden daha büyüktür ve brushit ile HA'nın kristal yoğunlukları sırasıyla 2,319 ve 3,080 g/cm³ olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.6. XRD paternlerinden elde edilen HA ve brushite ait kristal büyüklükleri ve kafes parametreleri.

Numune	Uzay Grubu	Latis Sabitleri (Å)			Kimyasal Formül	FWHM (°)	2θ° (I ₀₀₂)	Z	Yoğunluk (g/cm ³)	Birim Hücre Hacmi (Å ³)	Ortalama Kristal Boyutu D (nm)	Kristalinite X _c
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>								
Brushit	Ia (9)	5,812	15,18	6,239	CaHPO ₄ (H ₂ O) ₂	0,177	11,897	4	2,319	492,9	47,15	2,493
HA	P6 ₃ /m (176)	9,418	9,418	6,884	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	0,984	32,200	2	3,08	528,8	8,78	0,015

FWHM: Fazlar için en güçlü piklerine atı maksimum yüksekliklerinin yarısındaki genişlik.

Z: Birim başına formül birimi sayısı.

Yüksek kristalliğe sahip HA düşük biyobozunma gösterdiği için 5xSBF’de kaplanmış HA fazının kristal yapısının biyoaktiviteye etkisi göz önüne alındığında düşük kristal boyutuna ve düşük kristalliğe sahip olmasından dolayı dikkat çekmektedir. Brushit HA’dan daha yüksek kristalliğe sahip olmasına rağmen biyobozunurluğun HA’dan daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada brushit tek fazlı olarak yeni m-5xSBF ortamında başarılı bir şekilde kaplanmıştır.

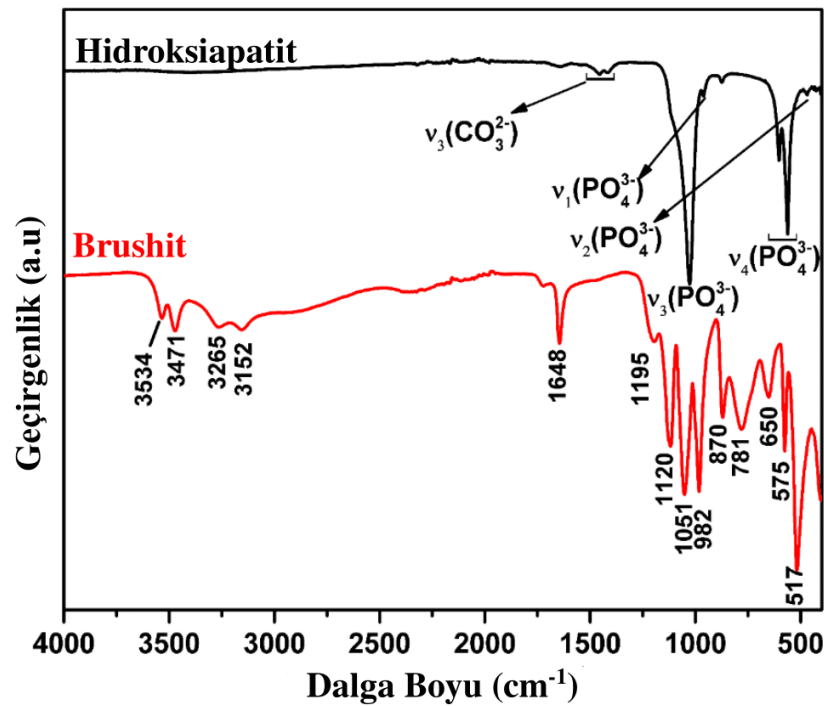
m-5xSBF ve 5xSBF çözeltilerine daldırıldıktan sonra sırasıyla oluşan brushit ve HA kaplı Ti6Al4V yüzeylerinin FTIR spektrumları Şekil 4.40.’ta verilmiştir. HA spektrumu için 1460-1420 cm^{-1} ’de tespit edilen çift pik karbonat grubunun (CO_3^{2-}) ν_3 gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. Karbonat grubu varlığının nedeni sırasıyla fosfat ve hidroksil iyonuna atfedilen A ve B hidroksiapatit yapı bölgelerinin numune ortamından ve/veya atmosferden CO_3^{2-} absorblamasından kaynaklanmaktadır.

A-tipi karbonatlı HA’nın 1455-1545 cm^{-1} ’de B-tipinin ise 1410-1455 cm^{-1} ’de CO_3^{2-} bantları gösterdiği bilindiğinden [98] CO_3^{2-} fazı OH^- gruplarından ziyade PO_4^{3-} gruplarının yerine geçen B-tipine atfedilmiştir. Kemikteki HA fazı PO_4^{3-} yerine ikame edilen ağırlıkça %2 ila %6 CO_3^{2-} içermektedir [259, 260]. Karbonatın HA’nın kristal büyümesini inhibe ettiği ve kristallenmeyi bozduğundan dolayı [261] saf HA’ya kıyasla CO_3^{2-} süstitüe edilmiş HA tozları düşük partikül büyüklüğüne [27] sahiptir ve karbonatın yapıya katılması genellikle HA’nın biyoaktivitesini arttıran düşük kristaliniteye neden olmaktadır [41].

HA’nın FTIR spektrumunda gözlemlenen fosfat (PO_4^{3-}) modlarının karakteristik pikleri şu şekilde açıklanmıştır: 470 cm^{-1} ’deki pik düzlem dışı eğilmeye ν_2 (PO_4^{3-}) karşılık gelmektedir; 565 ve 607 cm^{-1} civarındaki iki pik karakteristik düzlem eğilmesine ν_4 (PO_4^{3-}) karşılık gelir; ν_1 (PO_4^{3-}) simetrik gerilmesi 957 cm^{-1} ’deki absorpsiyona yol açmaktadır; 1100-1000 cm^{-1} aralığındaki çift pik ν_3 (PO_4^{3-}) asimetrik gerilme modlarına karşılık gelmektedir. Apatit kafesindeki PO_4^{3-} ’ın polihedronlara ait karakteristik moleküler yapılarına atfedilmiş olan fosfat pikleri [259]’de gösterildiği gibi literatürle uyumludur. Brushitin FTIR spektrumuna bakıldığında 3534, 3471,

3265 ve 3152 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleri brushit kafesindeki su moleküllerinin O-H gerilmelerine karşılık gelmektedir. 1648 cm^{-1} 'deki pik kafes moleküllerinin H-O-H bükülme titreşimi iken, P=O ile ilişkili gerilme titreşimleri 1195, 1120 ve 1051 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 982, 870 ve 781 cm^{-1} 'deki absorpsiyonlar P-O-P asimetrik gerilme titreşimlerine karşılık gelirken, suya ait titreşim modu 650 cm^{-1} gözlemlenmektedir. PO_4^{3-} 'a ait absorpsiyon piklerini içeren FTIR sonuçlarının Raman ve EDS analizleri ile uyumludur.

Ayrıca literatür çalışmaları [262–267] ilgili fosfat piklerinin brushit spektrumunda gözlemlendiğini doğrulamıştır. 1120, 1051 ve 982 cm^{-1} 'deki keskin PO_4^{3-} bantları, XRD paternleri ile tutarlı olarak brushit kristallerinin yüksek kristaliniteye olduğunu göstermektedir. 575 ve 517 cm^{-1} 'de gözlemlenen iki bant fosfata ait (H-O-) P=O bükme titreşim modlarından kaynaklanmaktadır. Brushit için elde edilen FTIR sonuçları, XRD ve Raman spektroskopisi ile elde edilen verilerle iyi bir uyum içindedir. P=O bağının, kristalin suyun ve O-H grubunun varlığı nedeniyle FTIR spektroskopisi brushit kristallerinin elde edildiğini doğrulamaktadır.

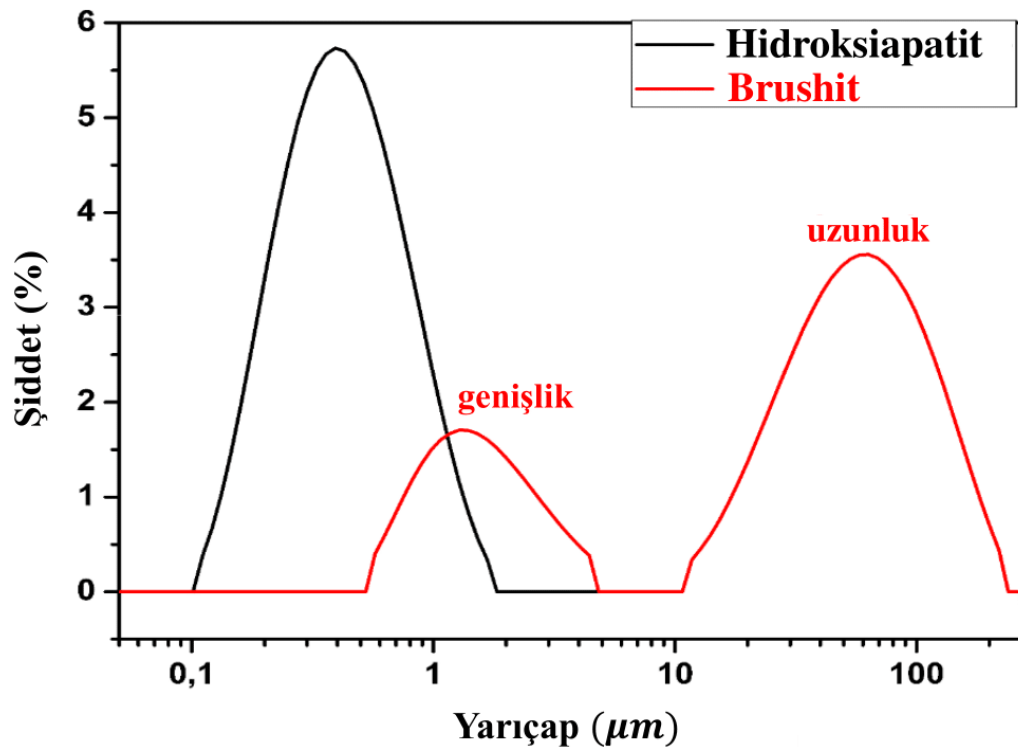


Şekil 4.40. m-5xSBF ve 5xSBF’de biyomineralizasyon sonrası sırasıyla brushit ve HA ile kaplanmış Ti6Al4V substrat yüzeylerinin FTIR spektrumları.

Ti6Al4V yüzeyi üzerindeki m-5xSBF ve 5xSBF’de biyomineralizasyon yoluyla kaplanmış brushit ve HA katmanlarının parçacık boyut dağılımları Şekil 4.41.’de gösterilmiştir. Partikül boyut dağılımı grafiğine bakıldığında hidroksiapatite ait olan grafikte bir tepe noktası görülürken brushite ait olan grafikte iki tepe noktasının varlığı tespit edilmiştir.

Kaplanmış HA tabakalarının parçacık boyutunun 0,1 ila 1,8 μm arasında değişmesinin Şekil 4.35.d’deki FESEM görüntüsünden görüleceği gibi aglomerasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kaplanmış brushit tabakaların boyut dağılım eğrileri iki ayrı pik olarak analiz edilmiştir. 0,5-4,7 μm arasındaki pikin parçacık boyutu dağılımının genişliğine 10,7-239,4 μm arasındaki pikin ise uzunluğa karşılık geldiği düşünülmektedir. Ayrıca parçacık genişliğinin ve uzunluğunun partikül boyutu analizindeki oranlara benzer olduğu SEM görüntüleri ile desteklenmektedir (Şekil 4.35.a, b).



Şekil 4.41. m-5xSBF ve 5xSBF’de biyomineralizasyon ile Ti6Al4V yüzeyine kaplanmış brushit ve HA tozlarının partikül boyut dağılımları.

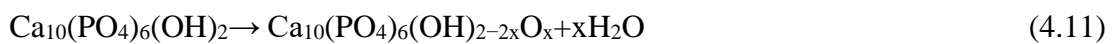
Hidroksiapatite ve brushite ait termogravimetrik analizler 25-900°C arasında 10°C/dk ısıtma hızında kaydedilmiştir ve Şekil 4.42.'de gösterilmiştir. Brushite ait grafikte TGA eğrisi iki bölgede kütle kaybını göstermektedir [266]. 25°C-400°C aralığındaki ilk aşamada kristallerde bulunan adsorbe su 150°C'ye kadar çıkarılmıştır ve %2,1'lik ağırlık kaybına neden olmuştur. Daha sonra sırasıyla %18,9 ve %3,6 oranlarında kütle kaybı 200°C ve 400°C aralığında meydana gelmiştir. Termal bozunma reaksiyonları şu şekilde verilmiştir:



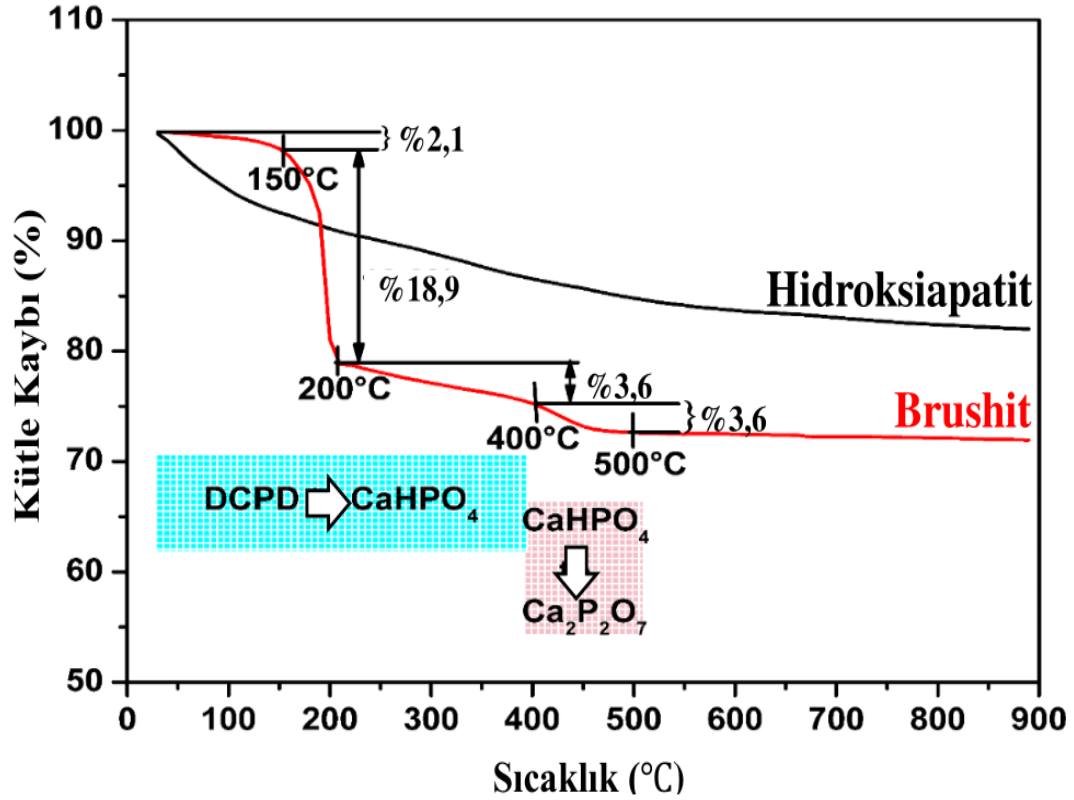
400°C-500°C aralığındaki ikinci aşamada iki monetit (CaHPO_4) molekülü birbiriyle birleşmekte ve su moleküllerinin ortadan kaldırılmasıyla ortaya çıkan ayrışmaya neden olmakta ve bu da monetitin kalsiyum pirofosfata ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) dönüşmesine yol açmaktadır. Aşırı su monetit yapısından uzaklaştırılmış ve numune %71,8'e kadar stabil kalmıştır. Termal bozunma ve kalsiyum pirofosfat oluşumu için olası reaksiyon şu şekildedir:



HA'nın yüksek termal kararlılığı nedeniyle N_2 atmosferi altındaki ısıtma sırasında yavaş gerçekleşen ve toplamda %17,9 olan kütle kaybı gözlemlenmiştir. Yüzeyde adsorplanan su molekülleri nedeniyle ilk aşamada kütle kaybı (%13,3) 400°C'ye kadar olan aralıkta gerçekleşirken, 400°C'nin üzerindeki sıcaklık aralığında meydana gelen ikinci aşamadaki kütle kaybı (%4,6) PO_4^{3-} iyonlarının ayrışmasıyla oluşan kristalin su kaybına karşılık gelmektedir. Bu dönüşüm aşağıdaki reaksiyonla kanıtlanabilir [268]:



600°C'nin üzerinde olan azalma HA numunesinde bulunan karbonat iyonları ayrışmasına karşılık gelebilir [65].

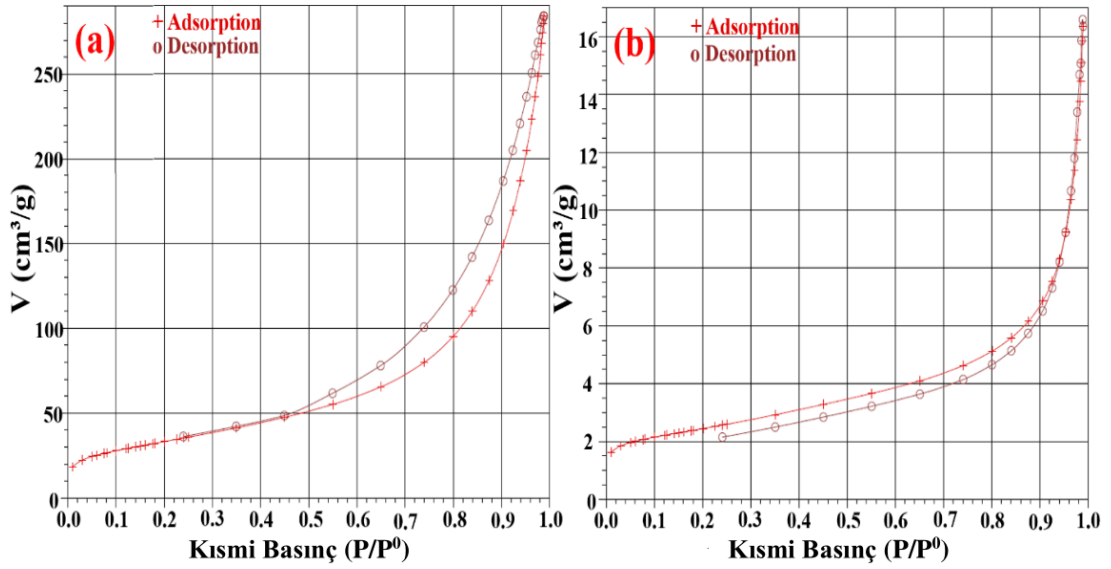


Şekil 4.42. m-5xSBF ve 5xSBF biyomimetik işlemleriyle Ti6Al4V üzerinde kaplanmış brushit ve HA kristallerinin TGA termogramı.

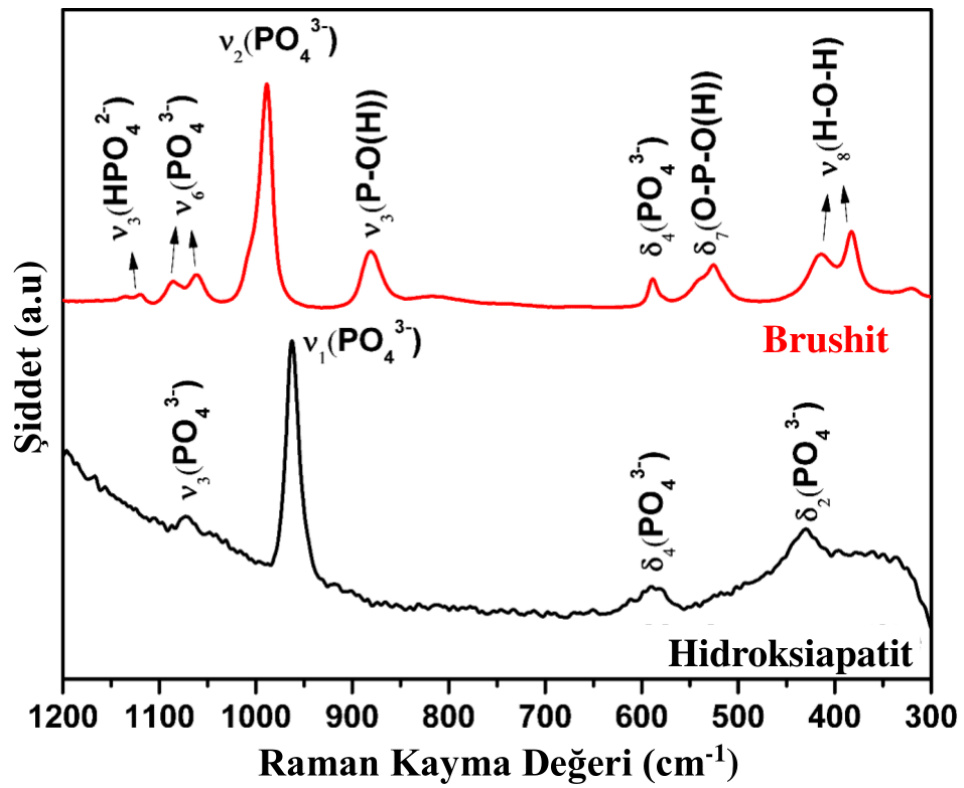
İmplant yüzeyindeki tozların yüzey alanı in-vivo protein adsorpsiyonunu ve hücre yapışmasını etkilemektedir. Tozların spesifik yüzey alanını belirlemek için azot adsorpsiyon ölçümleri geleneksel BET yöntemiyle gerçekleştirilmiştir ve Şekil 4.43.'de N₂ adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi gösterilmiştir. Kaplanmış brushit ve HA'nın gözenekli bir yapıya sahip olduğunu gösteren tip IV izotermine sahip oldukları görülmüştür. Brushit ve HA için spesifik yüzey alanları sırasıyla 85,623 ve 1169,412 m²/g olarak elde edilmiştir. Şekil 4.35. ve Tablo 4.6.'den görüleceği gibi brushitin yüzey alanı küçük morfolojik yapısı ve kristal boyutundan dolayı HA'dan daha düşüktür. Geniş yüzey alanı implantın hücre ve organik moleküller ile temas oranını artırabileceğinden dolayı önemlidir.

Brushit ve HA kaplanmış Ti6Al4V numunelerinin 300-1200 cm⁻¹ aralığındaki Raman spektrumları Şekil 4.44.'de verilmiştir. Brushit spektrumu için 990 cm⁻¹'deki en yoğun pik yapıdaki PO₄³⁻ iyonundaki P-O simetrik gerilme moduna (ν₂); 1084 cm⁻¹ ve 1062 cm⁻¹'de meydana gelen bant (ν₆) üçlü dejenere P-O gerilme moduna; 880 cm⁻¹'de

gözlenen bant P-O(H) simetrik gerilme moduna (ν_3); 589 cm^{-1} ve 527 cm^{-1} 'de bulunan pikler O-P-O(H) bükülme modunun δ_4 ve δ_7 titreşimlerine karşılık gelmektedir.



Şekil 4.43. Sırasıyla m-5xSBF ve 5xSBF biyomimetik prosesleri ile Ti6Al4V yüzeyine kaplanmış (a) Brushit ve (b) HA tozlarının N_2 adsorpsiyon-desorpsiyon izotermleri.



Şekil 4.44. Ti6Al4V üzerindeki kaplanmış brushit (siyah çizgi) ve HA (kırmızı çizgi) tozlarının sırasıyla m-5xSBF ve 5xSBF biyomimetik işlemleriyle (ν = gerilme, δ = bükülme) Raman spektrumları.

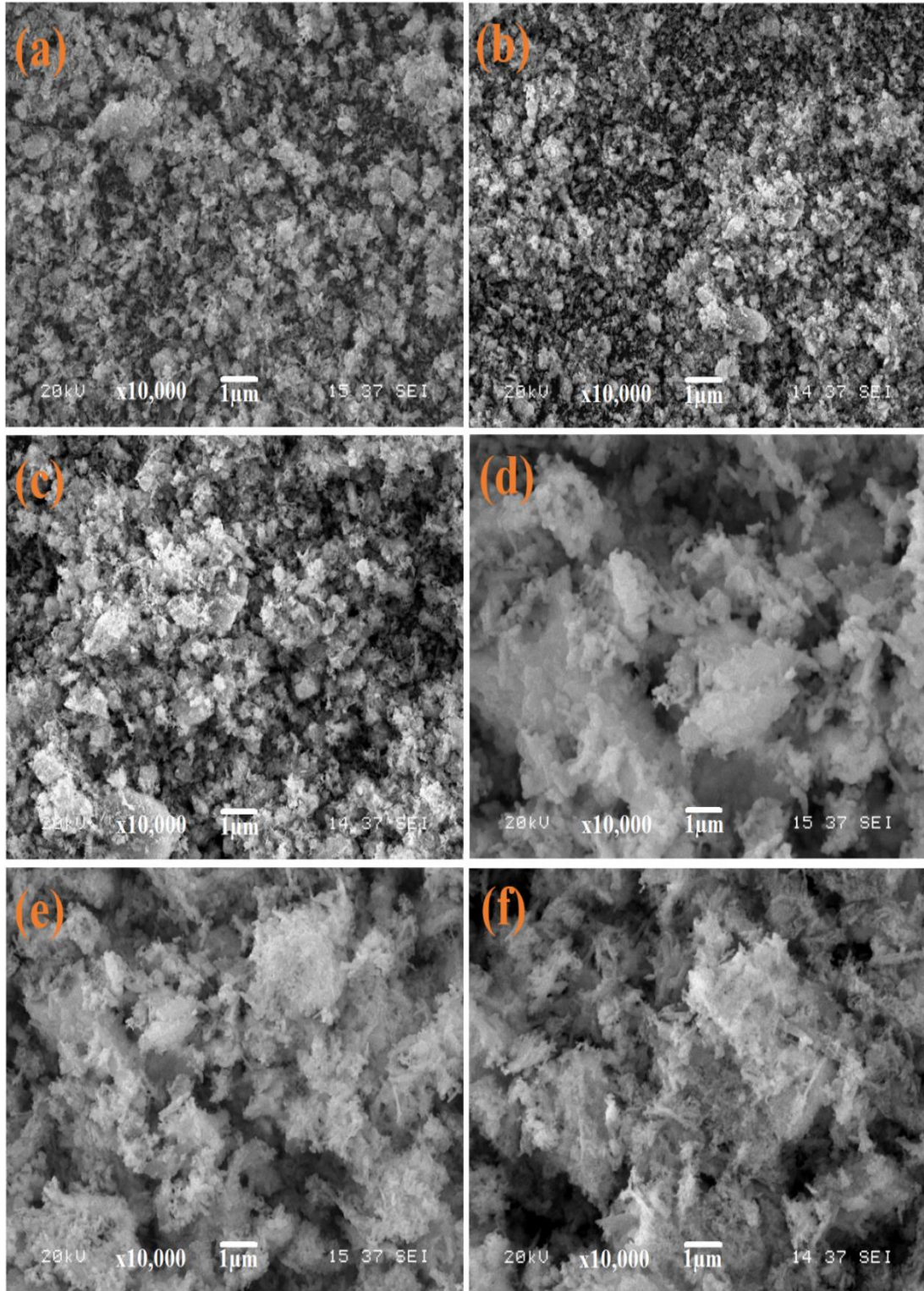
Su molekülüne ait olan ve çift dejenerasyonlu ν_8 titreşimine karşılık gelen pikler 413 cm^{-1} ve 382 cm^{-1} 'de görülmüştür. Şekil 4.44.'de görülebileceği gibi, HA'nın Raman spektrumunda tetrahedral PO_4^{3-} grubunun (P-O) karakteristik ve çok güçlü simetrik gerilme modu (ν_1) 961 cm^{-1} 'de görülmektedir. Bu pikten ayrı olarak, PO_4^{3-} grubunun çift dejenere bükülme modunu (OPO, δ_2), üçlü dejenere asimetric gerilme modu (P-O, ν_3) ve üçlü dejenere eğilme modu (O-P-O, δ_4) sırasıyla 430 , 1072 ve 587 cm^{-1} dalga boylarında meydana gelmektedir. Bütün bu fosfat gruplara ait pikler iç titreşim modlarına karşılık gelmektedir. Raman analizleri literatür sonuçlarıyla uyumlu şekilde [262] FTIR spektrumu sonuçlarını doğrulamaktadır.

Sentez sonrası ekstra kaplama işlemine gerek kalmadan monofazik HA ve brushit implant malzemesi olarak kullanılan Ti6Al4V üzerinde biyomimetik olarak biriktirilmiştir. Yenilikçi çözeltinin (m-5xSBF) kemik oluşumu için çok önemli olan monofazik brushit biyomalzemelerin herhangi bir ikinci faz olmaksızın farklı şekillerdeki implant malzemelerine biyolojik koşullarda biriktirilmesine izin verdiği ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir.

Böylelikle m-5xSBF'de olan kolay uygulanabilir biyomimetik yöntem kullanılarak monofazik brushit kaplı implantlar diğer CaP biyoseramik kaplı implantlarla karşılaştırıldığında in-vivo kemik yenilenmesini hızlandıracaktır.

4.6. Çözelti Ve Kalsinasyon Süresinin Sol-Jel Hidroksiapatit Sentezi Üzerine Etkisi Çalışması

950°C 'de 1 saat, 2 saat ve 4 saat boyunca kalsine edilmiş tozların morfolojileri Şekil 4.45.'te gösterilmiştir. Tüm kalsinasyon süreleri için nano boyutlu küresel nanoagregatların bir araya gelmesiyle oluşan ve ayrı iki çözücüde elde edilen bulut benzeri HA tozlarının eş morfolojide olmadığı bulunmuştur. Ancak su bazlı numunelerde bir dereceye kadar homojenlik, dar aralık büyüklüğü ve düşük dereceli toplanma olduğunu söylemek mümkündür.

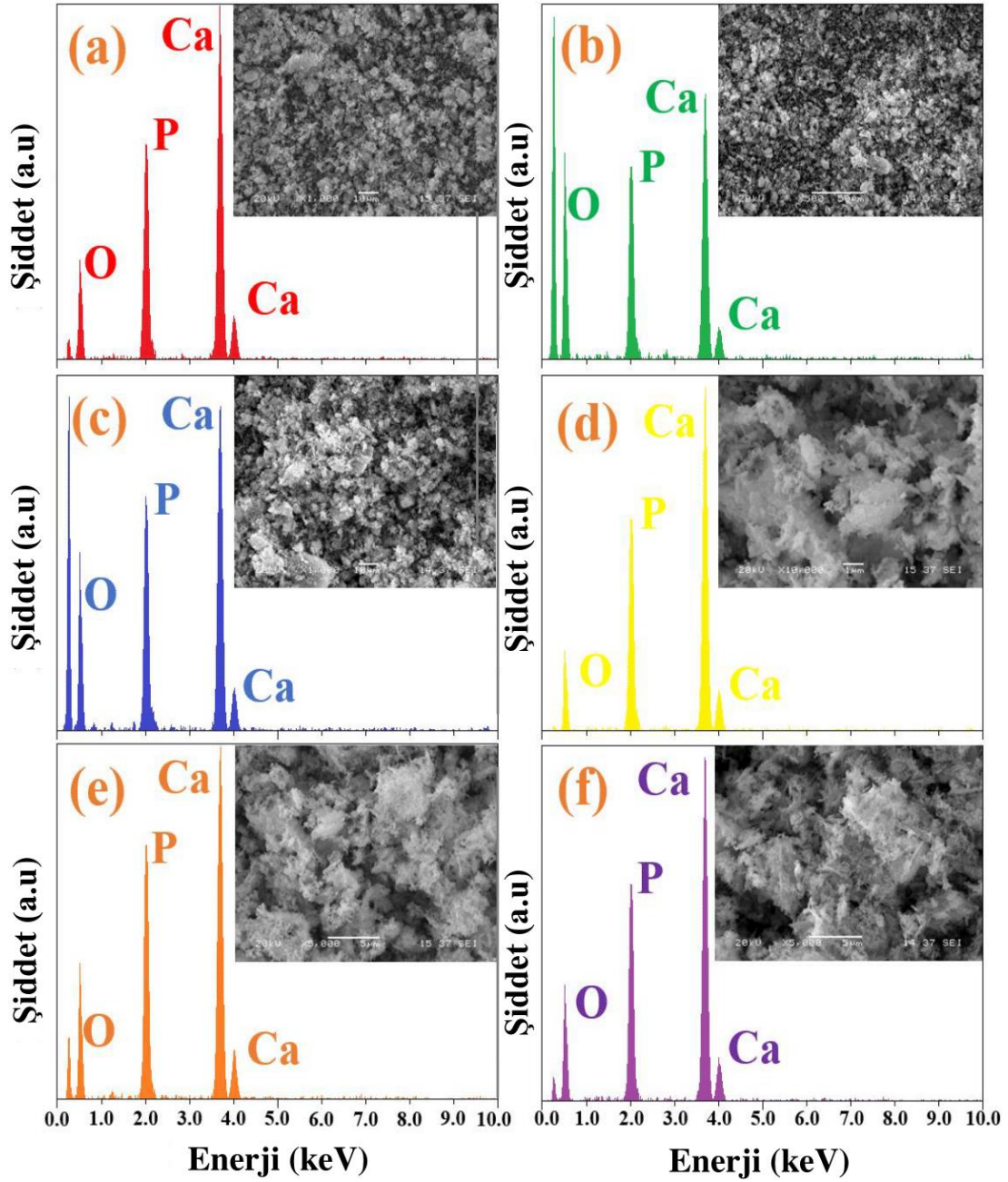


Şekil 4.45. (a) HA1, (b) HA2, (c) HA3, (d) HA4, (e) HA5 ve (f) HA6'nın SEM görüntüleri.

Şekil 4.46. ve Tablo 4.7.'de görülebileceği gibi EDS analizi ($\times 1000$ büyütmede) ile sentezlenen tozlarda bulunan tüm elementlerin HA'ya ait olduğu tespit edilmiştir.

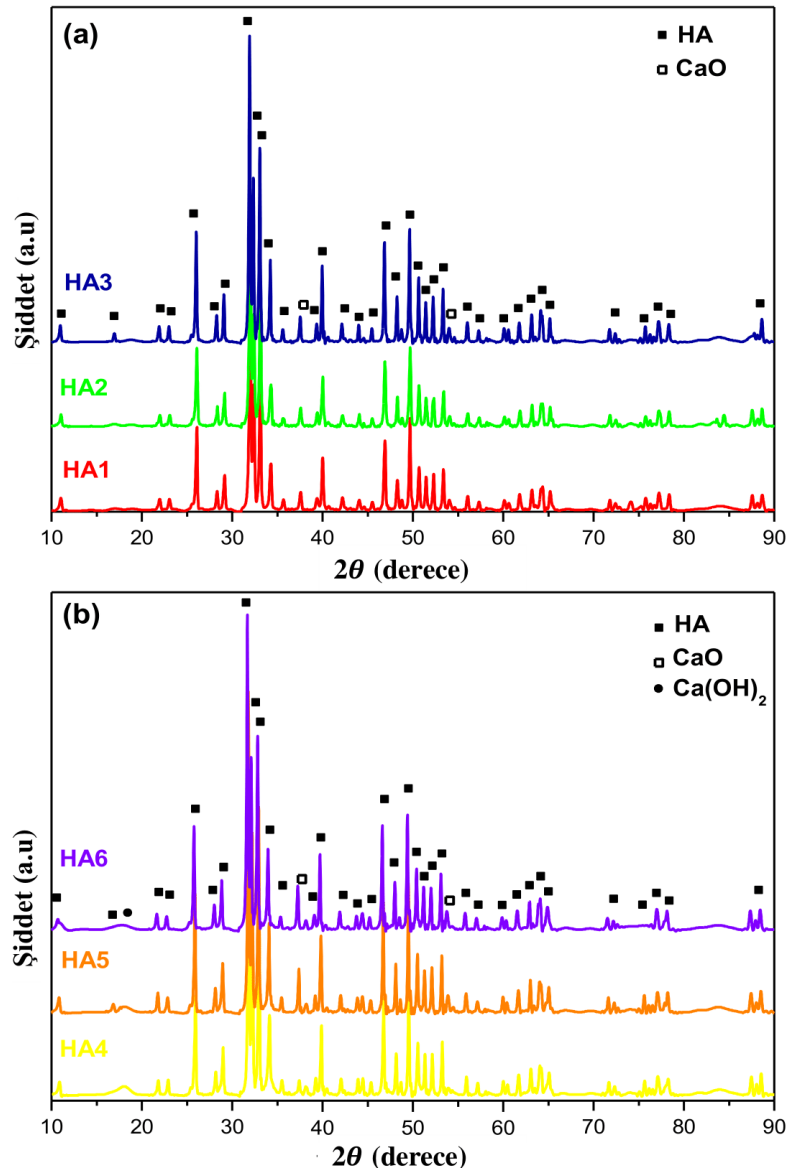
Tablo 4.7. HA1-HA6 numunelerinin EDS analizi.

Numune	O		P		Ca		Ca/P Atomik oran
	Ağ.	At.	Ağ.	At.	Ağ.	At.	
HA1	45,539	66,089	18,223	13,367	36,238	20,544	1,5369
HA2	58,046	75,781	15,363	10,360	26,591	13,859	1,3377
HA3	52,927	71,848	16,592	11,634	30,481	16,518	1,4198
HA4	40,623	60,9609	19,696	15,2675	39,681	23,7716	1,5570
HA5	46,273	66,106	19,401	14,317	34,326	19,577	1,3674
HA6	46,142	66,130	18,171	13,452	35,687	20,418	1,5178



Şekil 4.46. (a) HA1, (b) HA2, (c) HA3, (d) HA4, (e) HA5 ve (f) HA6'nın EDS analizleri

Su bazlı HA1-HA2-HA3 ve etanol bazlı HA4-HA5-HA6 tozları için X-ışını kırınım modelleri Şekil 4.47'de gösterilmiştir. Sentezlenen tozlarda HA, CaO ve Ca(OH)₂ fazlarının oluşumu XRD kullanılarak doğrulanmıştır ve kafes sabitleri MDI Jade 6.1 yazılımı ile tanımlanmıştır. XRD analizleri HA1-HA2-HA3 numunelerinin baskın olarak ICDD PDF kartı No. 86-0740 olan HA'dan ve az miktarda CaO'den oluştuğunu, HA5 numunesinin ICDD PDF kart No. 84-1998 olan HA'dan ve HA6'nın ICDD PDF kart No. 72-1243 olan HA'dan oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca Şekil 4.47.b'den görüleceği gibi HA4-HA5-HA6 numunelerinde CaO ve Ca(OH)₂ tespit edilmiştir. XRD analizlerinden bulunan değerler Tablo 4.8.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.47. Su bazlı (a) HA1-HA3 ve etanol bazlı (b) HA4-HA6 tozları için X ışını kırınım desenleri.

Tablo 4.8. XRD paternlerinden elde edilen HA1-HA6 numunelerinin kafes parametreleri ve kristal boyutları.

Numune	Uzay Grubu	Latis Sabitleri (Å)			FWHM (°)	2θ° (I ₀₀₂)	Z	Yoğunluk ρ (g/cm ³)	Ortalama Kristal Boyutu D (nm)	Kristalinite X _c
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>						
HA1	P6 ₃ /m (176)	9,352	9,352	6,882	0,247	26,099	2	3,2	34,5	0,92
HA2	P6 ₃ /m (176)	9,352	9,352	6,882	0,222	26,101	2	3,2	38,38	1,26
HA3	P6 ₃ /m (176)	9,352	9,352	6,882	0,201	26,022	2	3,2	42,39	1,70
HA4	P6 ₃ /m (176)	9,417	9,417	6,874	0,226	25,941	2	3,159	37,69	1,20
HA5	P6 ₃ /m (176)	9,417	9,417	6,874	0,216	25,882	2	3,159	39,43	1,37
HA6	P6 ₃ /m (176)	9,432	9,432	6,881	0,200	25,798	1	3,146	42,58	1,73

FWHM: Her bir numunenin (002) piklerinin maksimum şiddetlerinin yarı genişliği.

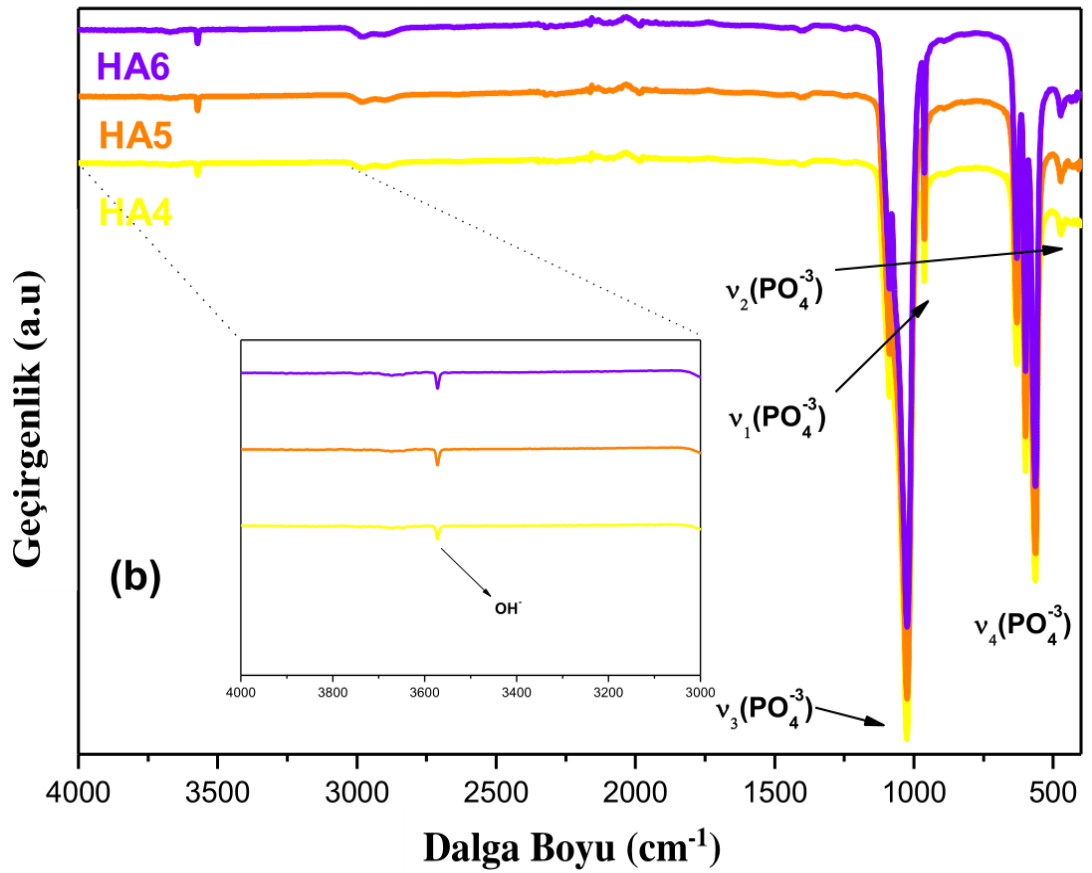
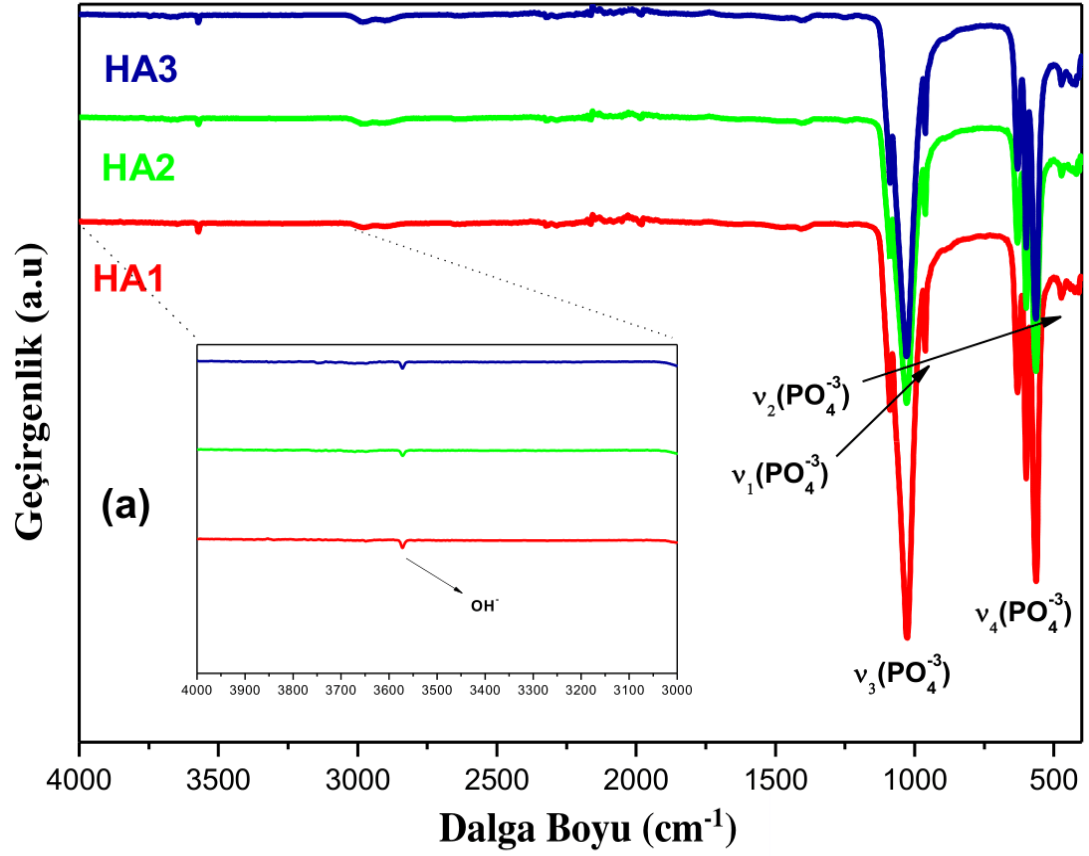
Z: Birim hücredeki molekül formül sayısı.

Sentezlenen tozların FTIR spektrumları Şekil 4.48.'de gösterilmiştir. Numunelere ait tüm spektrumlarda fosfat içi (PO_4^{3-}) titreşimlerinin karakteristik bantları görülmüştür. Spektrumlara bakıldığında 470 cm^{-1} 'deki bant ν_2 (O–P–O) bükülme titreşimine, 565 cm^{-1} ve 607 cm^{-1} 'deki iki bant karakteristik ν_4 (O–P–O) bükülme titreşimine karşılık gelirken 957 cm^{-1} bant ν_1 (P–O) simetrik gerilmeye ve 1100 cm^{-1} - 1000 cm^{-1} arasındaki çift bant ν_3 (P–O) antisimetrik gerilme titreşimine karşılık gelmektedir.

Şekil 4.45.'de gösterilen HA morfolojilerinin çekirdeklenmiş HA kristal yapıları ile su moleküllerinin –OH grupları arasındaki kovalent olmayan inter ve intramoleküler hidrojen bağlarından dolayı birbirlerinden farklı oldukları düşünülmektedir. Ca ve P çekirdeklenmesindeki bu güçlü etkileşim etanol ile karşılaştırıldığında kristal büyümesini azaltmıştır ve bu nedenle agregasyonda azalmaya neden olduğu düşünülmektedir. Aksine, alkoldeki moleküller arası hidrojen bağlanma etkileşimlerinin yoğunluğu sudakinden daha azdır ve bu nedenle HA kristalli yapılar arasındaki moleküller arası hidrojen bağ etkileşimleri sudakinden daha baskındır ve agregasyonda bir artışa neden olduğu düşünülmektedir. Tablo 4.7.'de verilen EDS analiz sonuçlarına göre HA1, HA4 ve HA6 numunelerinin Ca/P=1,5 olan kemik yapısında en yakın orandaki HA numuneleri oldukları tespit edilmiştir.

1, 2 ve 4 saat kalsinasyon süreleri ile sentezlenen su ve alkol bazlı numunelerin XRD sonuçları Şekil 4.47.'de gösterilmiştir. Baskın faz olarak HA ile birlikte CaO ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ fazları da gözlemlenmiştir. CaO (ICDD PDF kartı No. 48-1467) varlığı hem su (Şekil 4.47.a) hem de etanol bazlı (Şekil 4.47.b) tozlarının XRD sonuçlarında bildirilmiştir. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (ICDD PDF kartı No. 44-1481) etanol bazlı tozların XRD sonuçlarında ikincil faz olarak görülmüştür. Kalsinasyon zamanı arttığında HA zirvelerinde artış veya azalış olmazken diğer fazın pik yoğunluğu değişmiştir. En zayıf CaO pikleri su bazlı numunelerde olduğu gibi alkol bazlı numunelerde de 1 saatlik kalsinasyon süresi sonunda bulunmuştur.

XRD analizlerinden ikincil faz piklerinin [$2\theta=37,3^\circ$ 'te CaO (002) piki ve $2\theta=18,1^\circ$ 'de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (001) piki] hem su hem de alkol bazlı numunelerde kalsinasyon süresi ile arttığı bulunmuştur.



Şekil 4.48. (a) HA1-HA3 ve (b) HA4-HA6'nın FTIR spektrumları.

Hem kristalit boyutunun hem de kristalliğin kalsinasyon sıcaklığıyla arttığı bilinmektedir. Yüksek kristalliğe sahip HA düşük biyobozunurluk gösterir [207, 208] ve düşük kristalliğe sahip olan HA'lara kıyasla daha pürüzsüz yüzeye sahip tek tip düzenli şekle sahiptir [269].

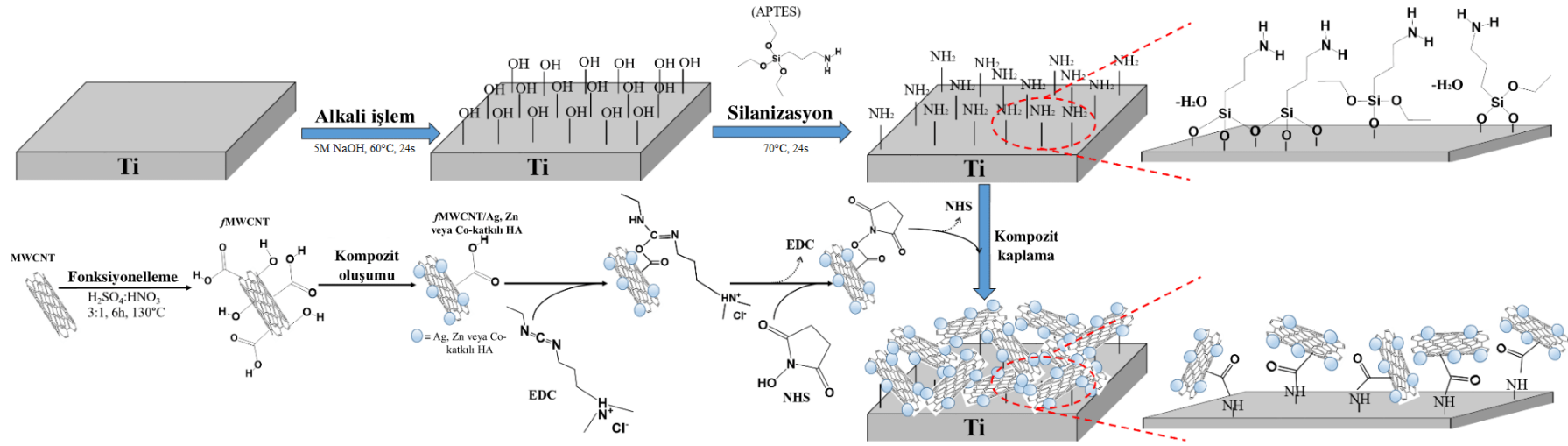
Elde edilen numunelerin hesaplanan kristalinite değerleri Tablo 4.8.'de verilmiştir. Kristalinite değerleri su ve alkol bazlı bir çözelti içinde hazırlanan HA tozları için sırasıyla 0,92-1,70 aralığından 1,20-1,73 aralığına artmıştır. Bu artış hazırlanan HA'nın kristalliğine kalsinasyon süresi ve çözelti ortamının etkidiğini göstermektedir. Her iki HA numunesindeki kristalleşmenin kalsinasyon süresini doğrudan orantılı olarak arttığı görülmüştür.

Bununla birlikte en düşük kristalinite su bazlı ortamda sentezlenen ve 1 saat boyunca kalsine edilen HA1'de gözlenmiştir. Bunun nedeni kalsinasyon süresinin morfolojiyi ve dolayısıyla literatürde bildirildiği gibi [270] kristalliği etkilemesidir. Çözelti ortamı ile kristalinitede önemli bir değişikliğin olmadığı gözlemlenmiştir.

Elde edilen FTIR titreşim bantları apatitin kafesinde PO_4^{3-} polihedronlarının karakteristik titreşim modlarını literatürle uyumlu bir şekilde göstermektedir [213, 214]. Spektrumlarda gözlenen 3738 cm^{-1} 'deki pik HA kafesinde bulunan OH^- iyonlarının gerilme titreşimine karşılık gelmektedir [215].

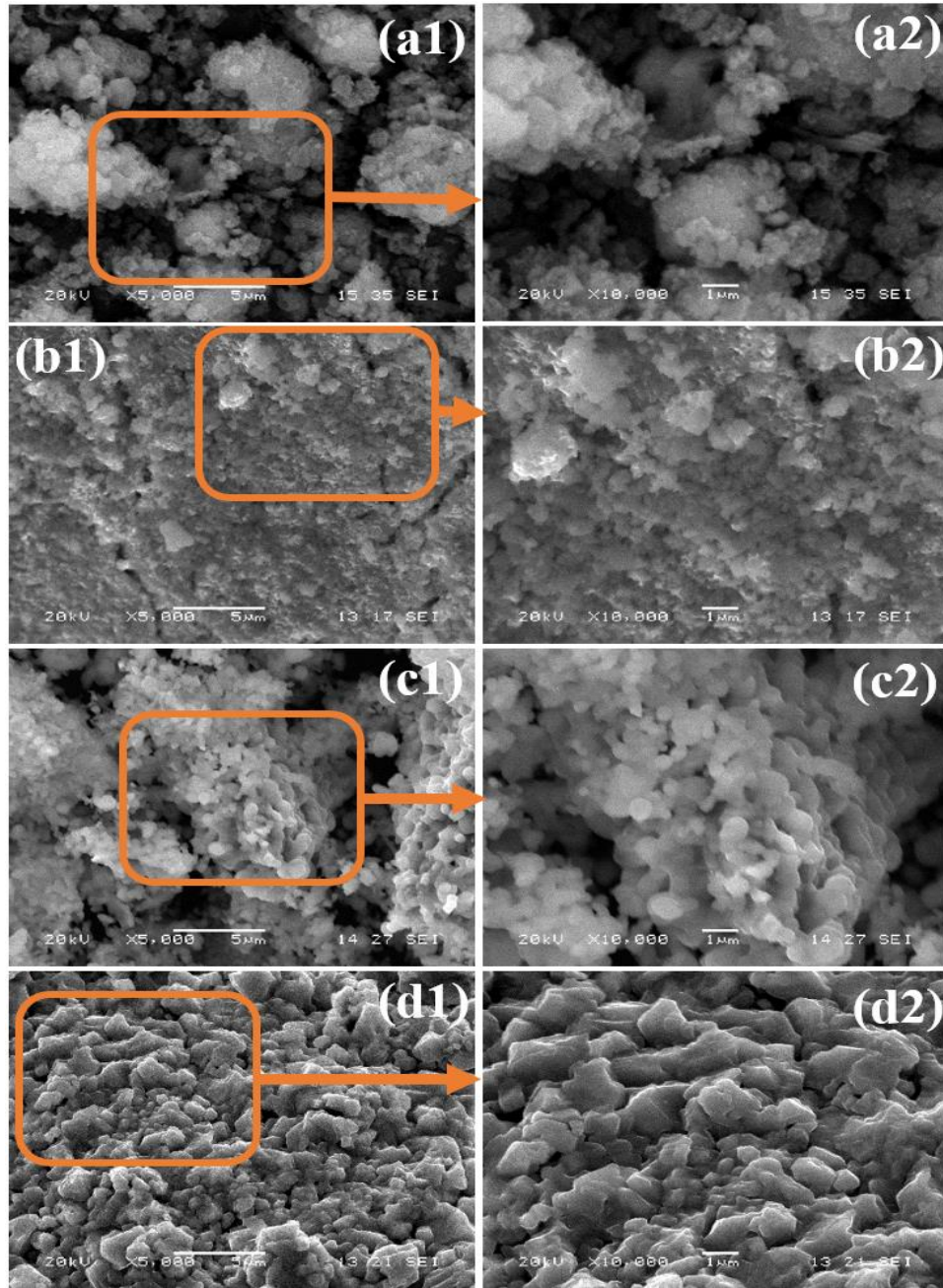
4.7. Ag, Zn veya Co Katkılı HA'nın Biyomimetik Sentezi ve Fonksiyonel Ti Üzerinde Ag, Zn veya Co Katkılı HA/fMWCNT Kompozitinin Kaplanması Çalışması

Doğal kemiğe yapısal ve içerik olarak benzer kompozit üretmek için Ti yüzeyine APTES immobilize edilmesinin ardından HA içerikli MWCNT lifleri Ti yüzeyine kimyasal olarak kaplanmıştır. Çalışma basamaklarını özetleyen akış şeması Şekil 4.49.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.49. Hem Ti'un silan ile hem de MWCNT'nin oksijen içeren fonksiyonel grupla fonksiyonellenmesinin, hazırlanan silanize edilmiş Ti yüzeyinde EDC ve NHS kullanılarak fMWCNT/Ag, Zn veya Co-katkılı HA kompozit kaplamının sistematik çizimi.

Katkılanmamış ve katkılanmış HA'nın SEM görüntüleri Şekil 4.50.'de verilmiştir ve numunelerin çoğunlukla kümelenmiş nano boyutlu parçacıklardan oluşan küresel partiküller içerdiği görülmüştür. Bu morfolojinin nanoboyutlu partiküllerin biyomimetik sentez sırasında çeşitli boyutlardaki gözenekli agregatlar şeklinde bir araya gelmesinden kaynaklandığı ve böylece HA partikülleri arasında güçlü bağlanmanın meydana gelebileceği düşünülmektedir.

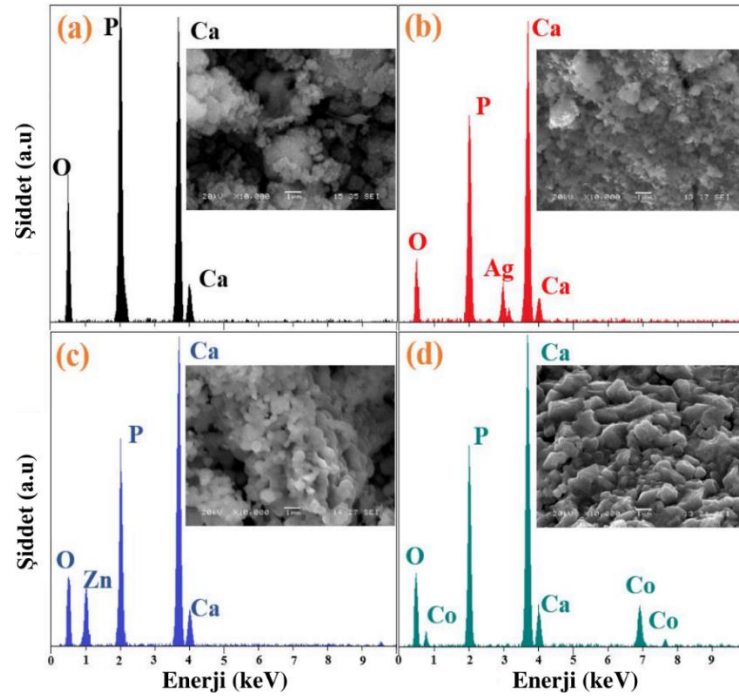


Şekil 4.50. (a) HA, (b) Ag-HA, (c) Zn-HA ve (d) Co-HA numunelerinin SEM görüntüleri.

DLS sonuçlarından elde edilen verilerle tutarlı olarak tüm görüntülerde düzgün aglomere olmuş nanopartiküller bulunurken Zn ve Co katkılı HA'ların boyutları katkılanmamış ve Ag katkılı HA'ya kıyasla Co-HA>Zn-HA>HA>Ag-HA şeklinde artmıştır. DLS ve XRD analizleri arasındaki farklılığın sebebinin DLS sonuçlarında da gösterildiği gibi sonikasyondan sonra bile agregasyona uğramış olan HA nanopartiküllerinin agregasyon eğilimi olduğu düşünülmektedir. Şekil 4.50.a-d'den görüleceği gibi SBF çözeltisine katkı iyonları eklendiğinde morfolojilerde dikkate değer bir değişiklik gözlemlenmiştir. Bu nedenle HA kristallerindeki morfolojik değişiklikler cSBF ortamında Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} 'ya dayandırılmaktadır ve SEM analizi kullanılan katkıya bağlı olarak çeşitli parçacık boyutlarını ortaya koymuştur.

Nanopartiküllerin elementel bileşimleri EDS alan analizi ile belirlenmiştir. Şekil 4.51.'de gösterildiği gibi sentezlenen nanopartiküllerde kirliliklere ait piklere rastlanmamıştır ve EDS analizi sonuçları gümüş, çinko veya kobalt elementlerinin varlığını doğrulamaktadır. Katkılama iyonlarının konsantrasyonu Tablo 4.9.'da verilmiştir. Şekil 4.51. ve Tablo 4.9.'da verilen analiz sonuçlarından sentezlenen numunelerin ortalama gümüş, çinko ve kobalt içeriklerinin % atom cinsinden sırasıyla 1,06, 1,78 ve 1,86 olduğu gözlemlenmiştir. Katkılanmamış HA'nın Ca/P atomik oranının 1,67'ye yakın olduğu ve katkılı HA'ların oranının 1,5-1,67 arasında değiştiği görülmüştür. Katkılı HA numunelerinin düşük Ca/P atomik oranı HA atomik yapısındaki Ca^{2+} iyonlarının bir kısmının yerini Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} iyonlarının aldığına atfedilmektedir. EDS analizi biyomimetik yöntemle Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} 'nın başarılı bir şekilde HA yapısına dâhil edildiği sonucunu desteklemektedir.

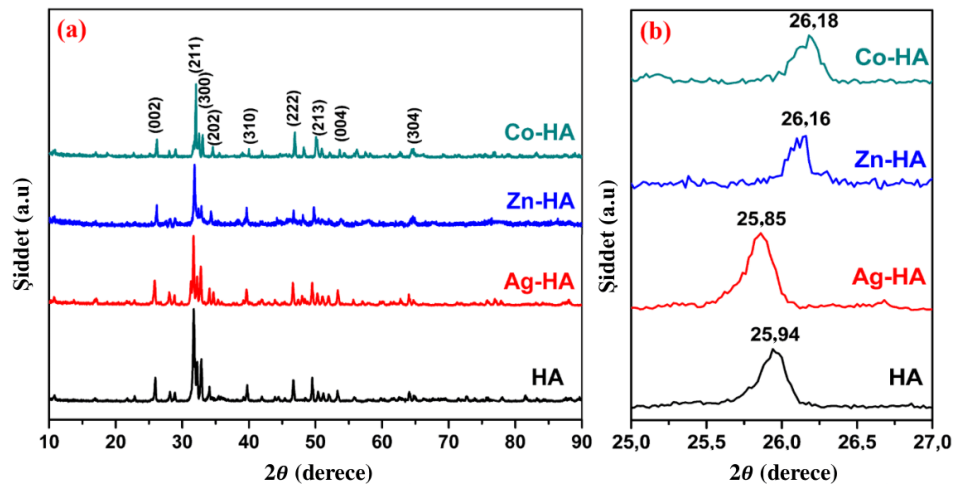
Şekil 4.52., Ag, Zn veya Co katkılı HA ve katkılanmamış HA'nın XRD analiz sonuçlarını göstermektedir. Sentezlenen tozların XRD desenleri (HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA), Şekil 4.52.a'da gösterildiği gibi ikincil fazların olmadığı monofazik saf HA'dan oluştuğunu göstermektedir. Faz saflığı in-vivo davranışı ve biyoseramiklerin biyoaktivitesini etkilediğinden monofazik tozlar biyomedikal alanda tercih sebeplerindedir. Gözlemlenen piklerin tümünün $P6_3/m$ uzay grubundaki altıgen HA referansına (ICDD kart numarası: 09-432) ait pikler olduğu belirlenmiştir ve iyon değişimi sonrası herhangi bir spektrumda HA'ya ait olmayan pik gözlenmemiştir.



Şekil 4.51. Sentezlenen a) HA, b) Ag-HA, c) Zn-HA ve d) Co-HA tozlarının EDS spektrumu.

Tablo 4.9. Biyomimetik sentezlenen HA, Ag-HA Zn-HA ve Co-HA tozlarının elementel bileşimleri.

Numune	Konsantrasyon (at.%)						Ca/P Atomik oram
	O	P	Co	Ca	Zn	Ag	
HA	59,37	15,56	-	25,07	-	-	1,66
Ag-HA	59,01	14,92	-	24,11	-	1,06	1,61
Zn-HA	57,61	16,79	-	23,74	1,86	-	1,50
Co-HA	59,22	15,25	1,78	23,75	-	-	1,56



Şekil 4.52. Sentezlenen HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın a) 10-90° aralığında genel ve b) 25-27° aralığındaki yakınlaştırılmış XRD spektrumları.

HA için ana XRD paternlerinin 2θ değerleri 32,9; 32,2; 31,7 ve 25,9'dur. HA'ya kıyasla Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'ya ait pik konumundaki hafif kaymalar Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} iyonlarının HA kristal kafesine girdiğini ve Ca^{2+} alanlarını işgal ettiğini göstermektedir. Bu kayma değerleri HA kristal yapısının c eksenini boyunca kristal büyümesini gösteren ve $2\theta=25-27^\circ$ arasında bulunan (002) pikleri için Şekil 4.52.b'de gösterilmiştir. Bu kayma apatit kafesinde artan latis bozukluğundan kaynaklanan iyon yer değiştirmeleri ile açıklanmaktadır [10].

Elde edilen bu sonuçlar Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} iyonlarının HA yapısına dâhil edildiğini doğrulayan ve Şekil 4.51.'de gösterilen EDS analizleriyle tutarlıdır. Katkılı HA kristal kafesinde bozukluklar meydana getirmiştir ve böylece herhangi bir ısıl işlem olmaksızın HA nanomalzemelerinin kristalliği değiştirilmiştir. Ag^+ (0,128 nm) iyonları Ca^{2+} (0,099 nm) iyonları yerine geçmekte ve kafes parametrelerinde bir büyümeye neden olmaktadır.

Tablo 4.10.'da verilen Ag, Zn veya Co-katkılı HA numunelerinin kafes parametreleri, ortalama kristal büyüklükleri ve birim hücre hacim değişiklikleri Debye-Scherrer ve Bragg denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Zn-HA kafes parametreleri Co-HA örneğinde olduğu gibi Ca^{2+} (0,099 nm) ve Zn^{2+} (0,074 nm) arasındaki iyonik yarıçap farkı nedeniyle değişmiştir. Zn ilaveli kafes parametrelerindeki azalma Zn^{2+} ve Ca^{2+} iyonik yarıçapları ile tutarlıdır.

Ayrıca HA tozlarındaki kobalt içeriğinin artırılması ile difraksiyon maksimumu daha büyük açılara kaydırılır yani birim hücre parametreleri azaltılır. Bu durum HA yapısının katyonik kristalografik pozisyonuna Ca^{2+} 'dan (0,099 nm) daha küçük bir iyonik yarıçapa sahip olan Co^{2+} (0,070 nm) ilavesi ile ilgilidir. Tablo 4.10.'da gösterildiği gibi Ca^{2+} 'dan daha küçük Zn^{2+} ve Co^{2+} katyonları kristal hacminde bir daralmaya sebep olurken Ca^{2+} 'dan daha büyük Ag^+ katyonu kristal hacminde bir artışa sebep olmaktadır. Dolayısıyla toplam hacimde meydana gelen değişiklik HA kafesinde kalsiyum yerine sübstitüe edilmiş katkı varlığını belirtebilir.

Tablo 4.10. XRD desenleriyle yansıtılan HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın kristalin boyutları ve kafes parametreleri.

Numune	Uzay Grubu	Latis Sabitleri ve Kantitatif Değişiklikleri (Δa ve Δc) (Å)				FWHM (°)	$2\theta^\circ$ (I_{002})	Ortalama Kristal Boyutu D (nm)	Kristalinite X_c	Birim Hücre Hacmi (V) ve Değişiklikleri (ΔV) (Å ³)	
		$a = b$	$\Delta a = \Delta b$	c	Δc					$a = b$	$\Delta a = \Delta b$
HA	P6 ₃ /m (176)	9,446		6,864		0,189	25,942	HA	P6 ₃ /m (176)	9,446	
Ag-HA	P6 ₃ /m (176)	9,451	0,005	6,888	0,024	0,155	25,849	Ag-HA	P6 ₃ /m (176)	9,451	0,005
Zn-HA	P6 ₃ /m (176)	9,417	-0,029	6,808	-0,056	0,250	26,160	Zn-HA	P6 ₃ /m (176)	9,417	-0,029
Co-HA	P6 ₃ /m (176)	9,346	-0,100	6,802	-0,062	0,200	26,183	Co-HA	P6 ₃ /m (176)	9,346	-0,100

FWHM: Her bir numunenin (002) piklerinin maksimum şiddetlerinin yarı genişliği.

Z: Birim hücredeki molekül formül sayısı.

XRD paternleri Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} katkılarına ait yoğunlukları ve pik kaymalarındaki değişimi göstermektedir. Ca^{2+} pozisyonlarına kıyasla Ag^+ ikamesi daha büyük ve Zn^{2+} ile Co^{2+} ikameleri daha küçük çapa sahip olduklarından dolayı düşük açığa doğru pik kayması Ag-HA'nın kafes genişlemesini doğrularken, daha yüksek açılara kayma ise Zn-HA ve Co-HA kafesinin büzülmesini doğrulamaktadır. XRD sonuçları kristal kafeslere ait a ve c parametrelerinin Ag^+ ile arttığını doğrularken Zn^{2+} ve Co^{2+} ile birlikte azaldığını doğrulamaktadır.

FTIR ve Raman spektrumları iyon ikamelerinin HA yapısının fosfat bantları üzerindeki etkisini araştırmak için analiz edilmiştir. HA'nın tipik karakteristik piklerinin yer aldığı kurutulmuş tozların (katkılanmamış ve katkılı HA'lar) FTIR spektrumunu Şekil 4.53.a'da gösterilmektedir. $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ (asimetrik bükülme titreşim modu) 560 ile 630 cm^{-1} arasında ortaya çıkmıştır ve 466 cm^{-1} 'deki pik $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ (simetrik bükülme titreşim modu) moduna karşılık gelmektedir. Ayrıca, 960 cm^{-1} 'deki pik $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ (simetrik gerilme modu) ve 1035 cm^{-1} 'deki pik $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ (asimetrik gerilme titreşim modu)'na aittir. Tüm numunelerde PO_4^{3-} gruplarına ait olan titreşim modları gözlemlenmiştir. Böylece HA oluşumu PO_4^{3-} 'ye ait bükme ve gerilme modlarının varlığından dolayı FTIR spektrumları ile doğrulanmıştır. Ayrıca tüm spektrumlarda HA'nın yapısal OH^- gerilme modlarına atanan 3573 cm^{-1} 'de dar bant gözlenmiştir.

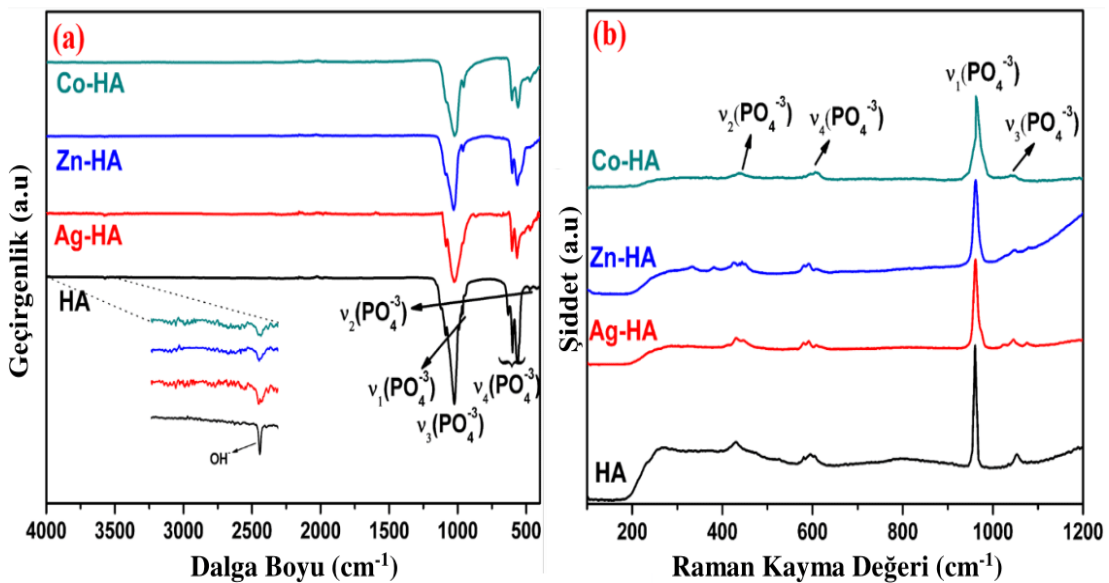
FTIR ve Raman spektrumlarında apatit yapısına ait olmayan pikin olmaması biyomimetik yöntemle sentezlenen Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın katkılanmamış HA ile aynı yapıyı koruduğunu göstermektedir. Katkılı HA'ların PO_4^{3-} bantlarında katkılanmamış HA'ya göre azalmış bant yoğunluğu ve artmış bant genişliği gözlemlenmesi kristal yapısında PO_4^{3-} bölgelerinde oluşmuş olan kusurlara atfedilmiştir. HA kristal yapısındaki bu kusurların Ca^{2+} 'un Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} iyonlarıyla yer değiştirmesinin sonucu olduğu düşünülmektedir.

Katkılanmamış HA ile kıyaslandığında Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA numunelerinin spektrumlarında kayda değer bir hat kayması ve bunun muhtemelen neden olacağı kafeste dikkat çekici bir interatomik mesafe değişikliği gözlenmemiştir. Ca^{2+} iyon çapına kıyasla Ag^+ iyon çapının biraz daha büyük ve Zn^{2+} ve Co^{2+} iyon çaplarının ise

biraz daha küçük olduğundan dolayı dikkate değer olmayan kayma düşük katkılama seviyeleri için beklenebilir.

Biyomimetik yöntemle sentezlenen katkılanmamış ve Ag, Zn veya Co katkılı HA numunelerinin Raman spektrumları Şekil 4.53b'de göstermektedir. İncelenen spektrumların tüm HA tozları için hemen hemen aynı olduğu görülmüştür. Her bir spektrumda şu ilgili bantlar yer almaktadır: 430 cm^{-1} (ν_2 , O-P-O, ikili dejenere bükülme modu); 608 cm^{-1} (ν_4 , O-P-O, üçlü dejenere bükülme modu,); 960 cm^{-1} (ν_1 , P-O dejenere asimetrik gerilme modu) ve 1046 cm^{-1} (ν_3 , P-O üçlü dejenere asimetrik gerilme modu).

Ag, Zn ya da Co katkılı HA'ların Raman bantlarının katkılanmamış HA'nunkilerle aynı olduğu söylenebilir. Spektrumlar arasında sadece bantların nispi yoğunluk ve genişlik farklılıkları vardır ve genel spektrum bant konumu ile bant sayısı açısından değişmemektedir. HA'dan Ag, Zn veya Co katkılı HA'ya doğru pik genişlemelerinin ve ν_1/ν_2 , ν_3 , ν_4 yoğunluklarındaki azalmanın HA kristal yapısındaki düzensizlik ve HA kafesindeki Ca^{2+} kristalografik pozisyonlarına Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} iyonlarının eklenmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.



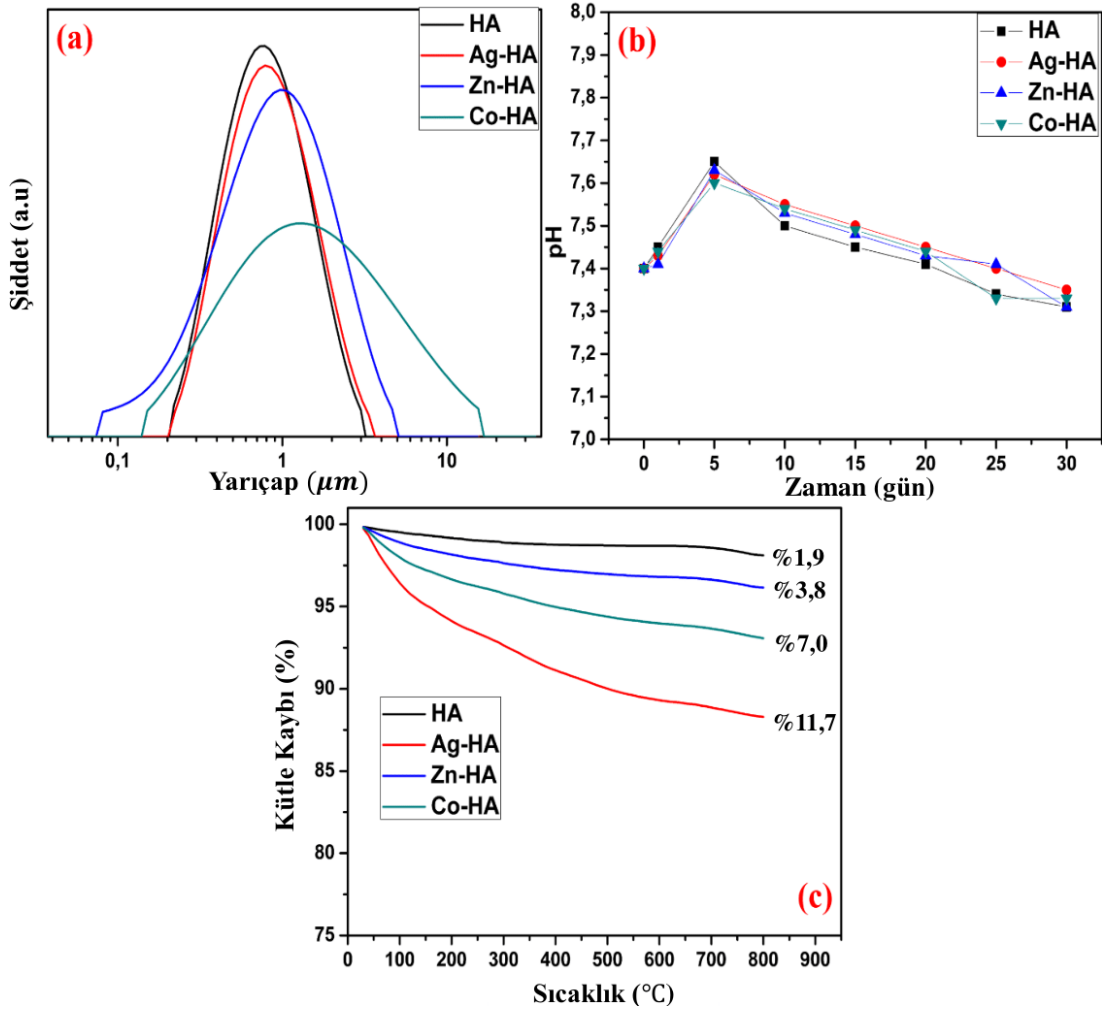
Şekil 4.53. HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın (a) FTIR ve (b) Raman spektrumları.

Şekil 4.54.a'daki partikül boyut dağılım verilerinden katkılı HA'nın katkılanmamış HA'dan daha büyük parçacık büyüklüğü dağılımına sahip olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin DLS analizi sırasında su süspansiyonunun translasyon hareketindeki daha fazla olan anizotropisi olduğu düşünülmektedir. Sentezlenen tozların ortalama tanecik ebadı 0,07-16,75 μm aralığında olduğu görülmüştür.

HA'ya Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} katkıları kristallerin birbirlerine yapışma eğilimini arttırmakta ve büyük partiküllü agregaların oluşumuna neden olmaktadır. Bu büyük parçacıkların kompakt aglomerasyonların bir araya gelmesi ile oluştuğu düşünülmektedir. Katkı iyonları ile artan aglomerasyonun bu iyonlardan kaynaklandığı ve özellikle Co^{2+} 'nin biyomimetik sentez sırasında cSBF'deki nanopartikül aglomerasyonunu desteklediği düşünülmektedir. Böylece aglomerat morfolojilerinin HA kristal yapısındaki yabancı iyon içeriği nedeniyle değişmekte olduğu sonucuna varılmıştır.

Pelet haline getirilmiş olan numuneler 1xSBF 1 ay boyunca bekletilmelerinin ardından Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} içeren SBF pH'ı her bir zaman noktasında belirlenmiştir. Her bir daldırma zaman noktası için ortalama pH değerleri Şekil 4.54.b'deki grafikte gösterilmektedir. İlk olarak pH HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA için sırasıyla 7,4'ten 7,45; 7,43; 7,42 ve 7,44'e artmış; 3. günde 7,65; 7,62; 7,63 ve 7,60'a yükselmiştir. On gün sonra SBF pH'ı HA peletleri için ortalama 7,5, Ag-HA peletleri için 7,55, Zn-HA peletleri için 7,53 ve Co-HA peletleri için 7,54 olarak bulunmuştur. Onuncu günden sonraki her bir zaman noktasında pH giderek azalan bir eğilim göstermiştir. 4 hafta sonunda pH'ın HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA peletleri için sırasıyla 7,31; 7,35; 7,32 ve 7,33'e düştüğü görülmüştür.

3 gün sonraki pH artışı malzeme bozulmaya başladığında hidroksil gruplarının salınmasından kaynaklanmakta ve bu da pH'da artışa neden olmaktadır. Ag, Zn veya Co katkılı HA'nın pH profilinin katkılanmamış HA'nın pH profilini taklit ettiği ve sentezlenen malzemedeki Ag, Zn veya Co'nun çevre dokuya zarar verebilecek olan asidik koşullara neden olmadığı görülmüştür.

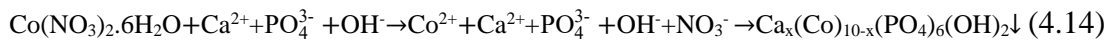
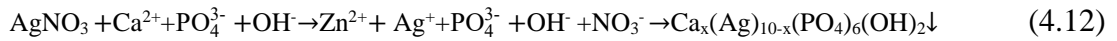


Şekil 4.54. (a) Parçacık boyut dağılımı, (b) Pelet daldırma süresine karşılık pH değişimi ve (c) TGA ile analiz edilen saf HA ve Ag, Zn, Co-HA malzemelerinin ısıl kararlılıkları.

Katkılanmamış ve Ag, Zn veya Co katkılı HA tozlarının azot ortamında 800°C'ye kadar ısıtılarak elde edilen termogravimetrik analizleri Şekil 4.54.c'de gösterilmektedir. 200°C'nin altındaki ağırlık kaybı muhtemelen sentezlenen tozlarda fiziksel olarak adsorbe edilmiş suyun serbest bırakılmasından kaynaklanmaktadır. İkinci ağırlık kaybının olduğu 200 ila 800°C aralığında kristalin su uzaklaşmıştır. HPO_4^{2-} iyonlarının kondenzasyon reaksiyonu nedeniyle aşamalı olarak hidrosilasyona uğrayan HA'nın bu aşamadaki kütle azalması Ag-HA ve Co-HA için daha belirgindir. TGA eğrileri iyon eklenmeleriyle kalan kütlede farklılıklar olduğunu göstermiştir ve nihai kütle azalma oranları HA, Zn-HA, Co-HA ve Ag-HA için sırasıyla %1,9, %3,8; %7,0 ve %11,7 olarak bulunmuştur. Ag^+ ile Ca^{2+} iyonları arasındaki yük dengesizliği nedeniyle oluşan hidroksil bölgesindeki boşluk Ag-

HA'nın termal stabilitesini azalttığı düşünülmektedir. Şekilde gösterildiği gibi kafesteki H₂O miktarlarının Zn²⁺ veya Co²⁺ ikameleri ile artması Ca²⁺ iyonlarının Zn²⁺ ve Co²⁺ iyonlarından daha büyük yarıçaplı olmasına atfedilmiştir.

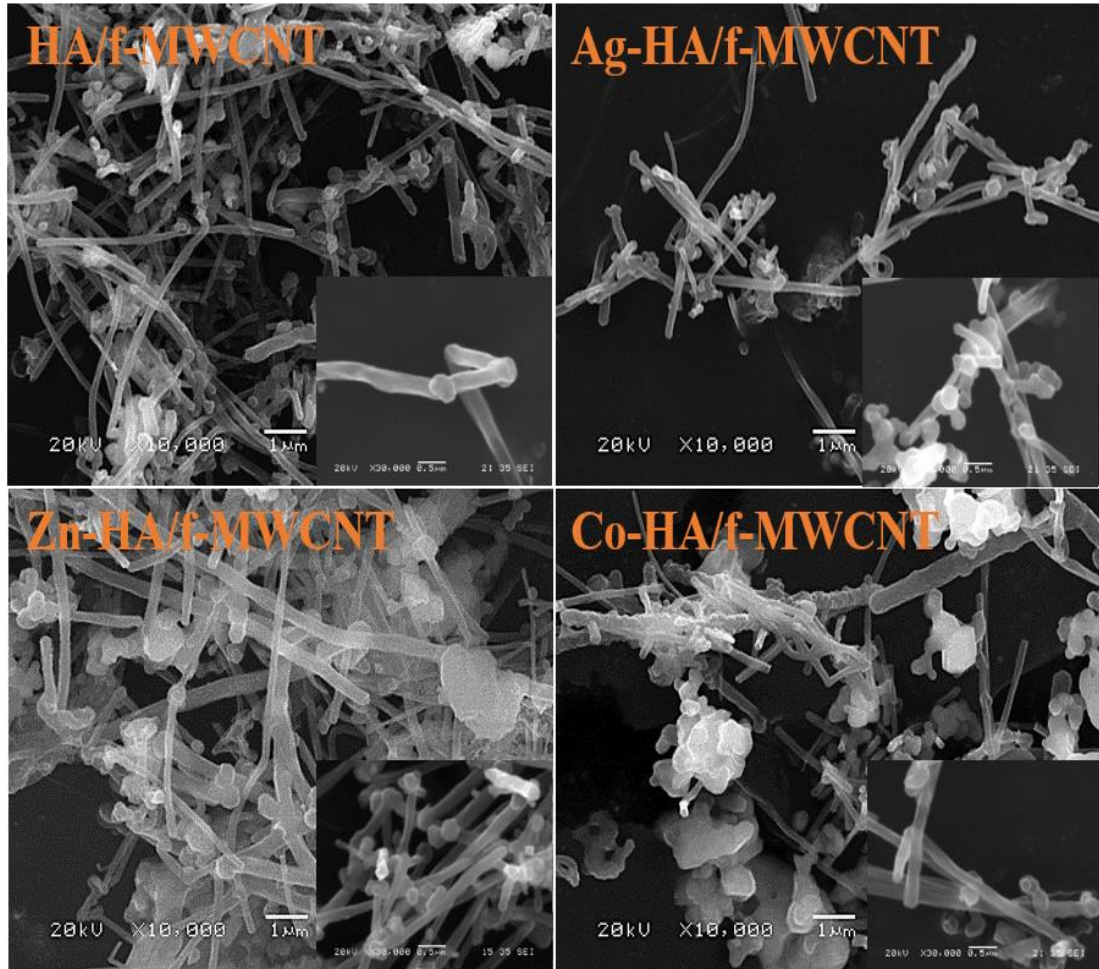
Burada hazırlanan çözeltilerdeki HA oluşum süreci karmaşık bir olgudur ve cSBF çeşitli iyonların ve iyon gruplarının birleşmesi/ayrışması ile ilgili olan bir dizi reaksiyon içermektedir. SBF'de iyon değişim reaksiyonu ile Ag-HA, Zn-HA veya Co-HA'nın olası oluşum mekanizmaları aşağıdaki (4.12), (4.13) ve (4.14) Denklemlerinde gösterilmiştir:



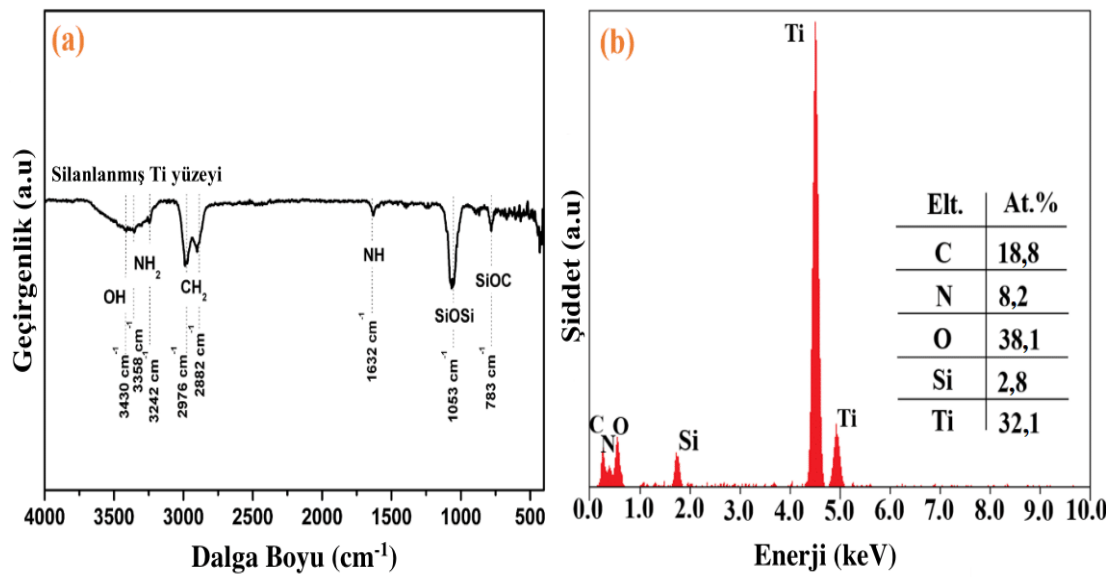
Şekil 4.55.'de gösterildiği gibi *f*MWCNT'lerin HA nanopartikülleri ile homojen olarak dağıtılması etanol çözeltisinde mekanik karıştırma ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Böylece HA ve *f*MWCNT-HA arasında oluşturulmuş olan moleküler seviyedeki temas HA ve *f*MWCNT'ler arasındaki ıslanabilirliği arttırmakta ve arayüzey bağı oluşturmaktadır.

Şekil 4.56.a'da verilmiş olan FTIR sonuçları alkali işlem sonrası Ti yüzeyine başarılı bir şekilde APTES modifiye edildiğini doğrulamakta ve moleküler bir köprü olarak silan bağlanma tabakasının Ti yüzeyinde elde edildiğini göstermektedir.

Ti-APTES'e ait FTIR analizine bakıldığında -NH₂'nin simetrik bükülme modu 1632 cm⁻¹'deki pike karşılık gelirken 1053 cm⁻¹'deki baskın pik ve 783 cm⁻¹'deki pikler Si-O-Si titreşim modlarına karşılık gelmektedir. Bu titreşimler yüzeyde APTES tabakasının olduğunu göstermektedir. Siloksan bağlanma tabakası olan APTES'in Ti yüzeyine kaplandığını doğrulayan Ti-APTES numunesinin yüzey elementel bileşimleri Şekil 4.56.b'ye eklenmiş olan EDS tablosunda gösterilmiştir.

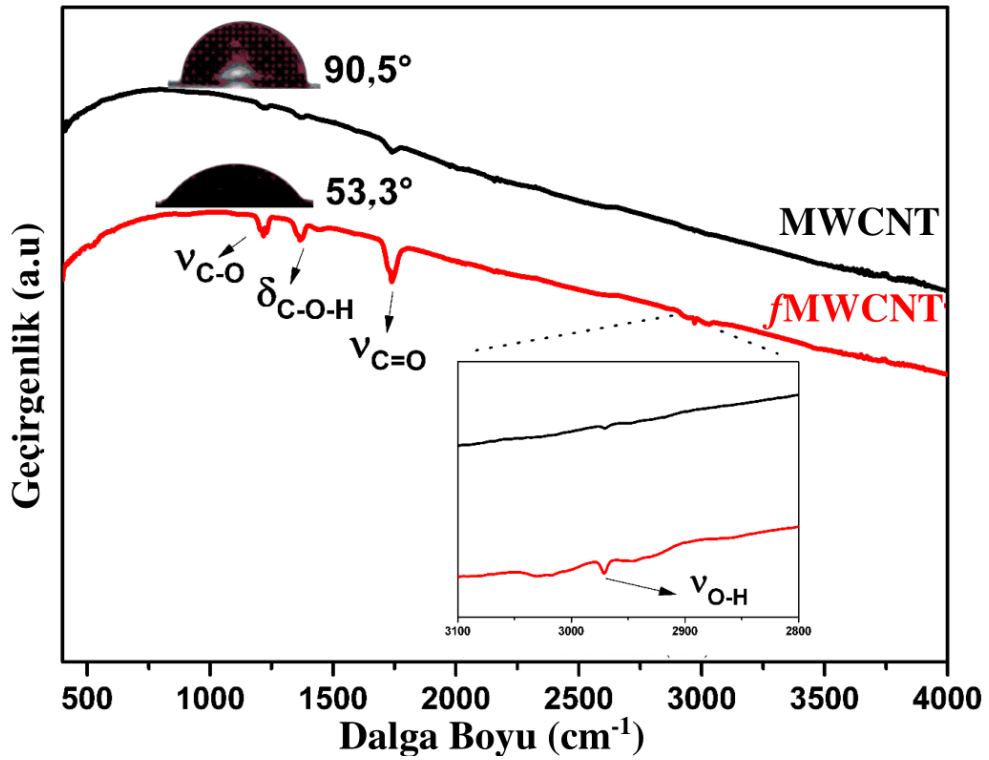


Şekil 4.55. Hazırlanan (a) fMWCNT/HA (b) fMWCNT/Ag-HA, (c) fMWCNT/Zn-HA ve (d) fMWCNT/Co-HA kompozitlerinin SEM görüntüleri.



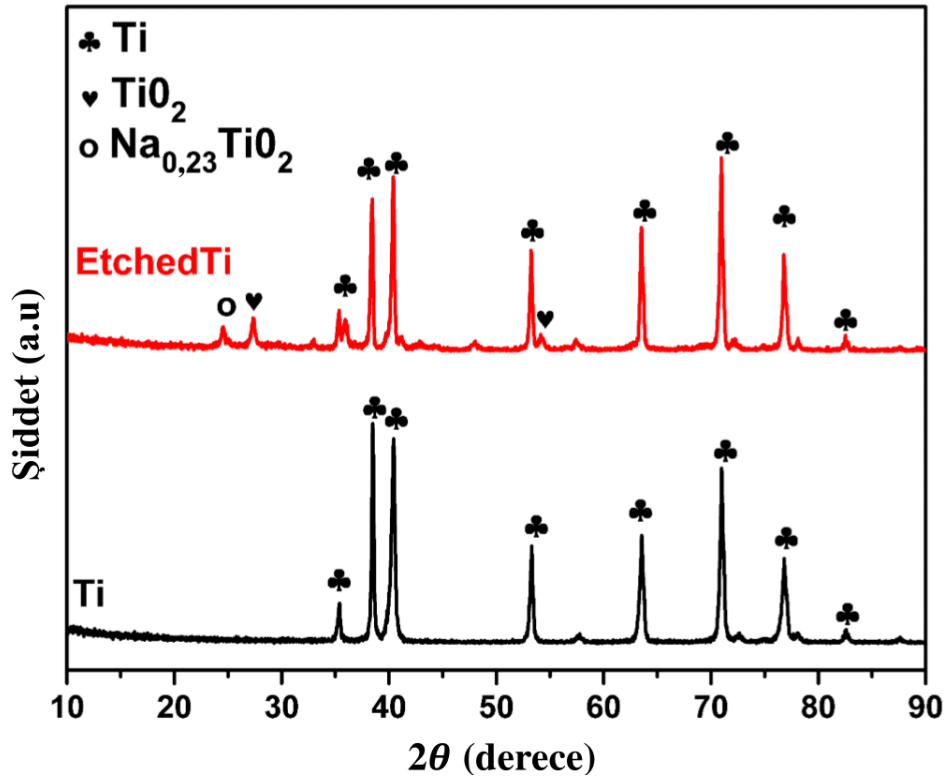
Şekil 4.56. Silanize Ti substrat yüzeyinin (a) FTIR ve (b) EDS spektrumları.

*f*MWCNT'ler saf MWCNT'lere kıyasla toksisitenin azalmasına ve hidrojen bağları oluşturmaya izin veren -OH ve -COOH grupları ile işlevselleştirilmiştir. *f*MWCNT'nin FTIR ve temas açısı ölçüm sonuçları Şekil 4.57.'de gösterilmiştir. Şekil 4.57.'de gösterildiği gibi ν_{C-O} , δ_{C-O-H} , $\nu_{C=O}$, ν_{O-H} frekansları sırasıyla 1218 cm^{-1} , 1353 cm^{-1} , 1738 cm^{-1} , 3000 cm^{-1} 'de belirlenmiştir. Hidrofilik etki oksijen içeren fonksiyonel gruplar ile artmaktadır ve temas açısının $90,5^\circ$ 'den $53,3^\circ$ 'ye düştüğü Şekil 4.57.'de görülmektedir. MWCNT yüzeyinde hidroksil ve karboksil gruplarının başarılı oluşumunu göstermek için FTIR ve temas açısı analizleri yapılmış ve çalışmanın sonraki adımları için gerekli olan negatif yükler *f*MWCNT yüzeyinde elde edilmiştir.



Şekil 4.57. MWCNT ve *f*MWCNT'nin FTIR spektrumları ve temas açıları.

Alkali işlem ile Ti yüzeyinde oluşan titanyum dioksit (TiO_2 , ICDD PDF kartı No. 21-1276) ve sodyum titanat ($\text{Na}_{0,23}\text{TiO}_2$, ICDD PDF kartı No. 22-1404) Şekil 4.58.'da gösterildiği gibi XRD analizi ile karakterize edilmiştir. $24,4^\circ$ ve $27,4^\circ$ 'deki pikler sırasıyla $\text{Na}_{0,23}\text{TiO}_2$ ve TiO_2 fazlarının oluşumunu işaret etmektedir. Sodyum titanat fazı Ti yüzeyinin aktivasyonunu ve biyoaktivitesini artırırken; TiO_2 katmanı da APTES ve Ti yüzeyi arasındaki bağ kuvvetini artırma özelliğine sahiptir.

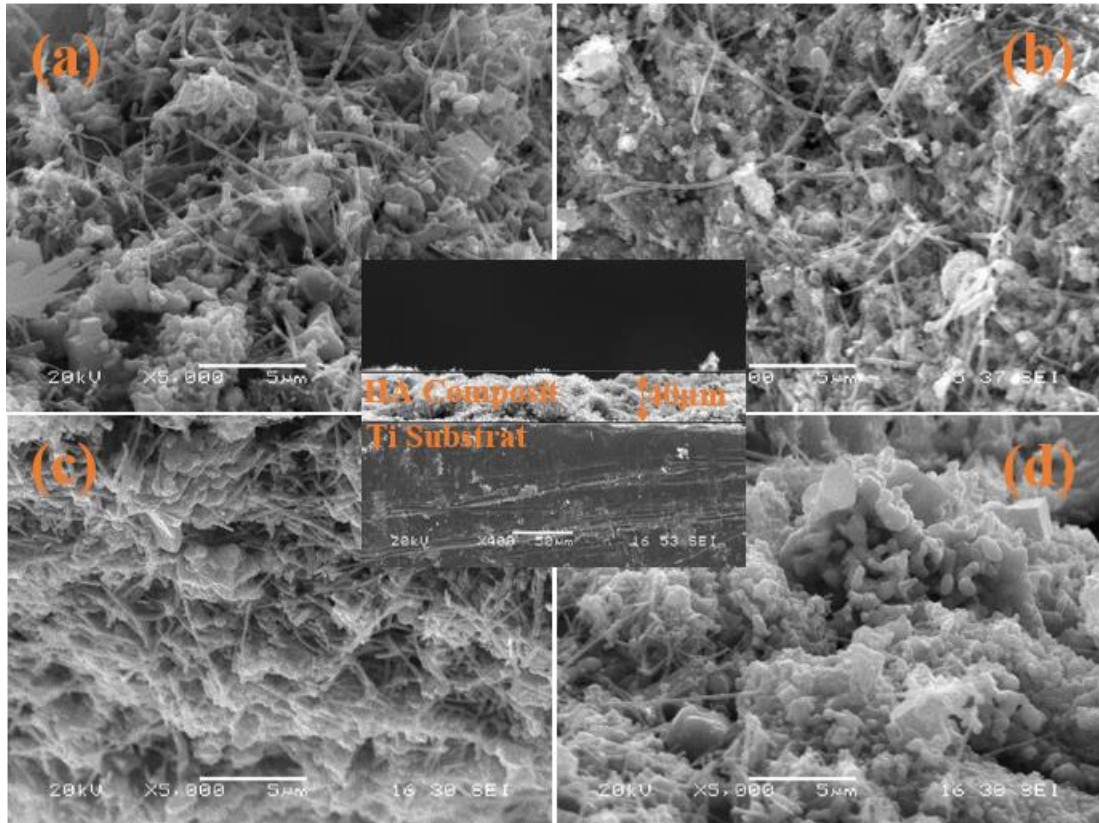


Şekil 4.58. Ön yüzey işleme öncesi ve sonrası Ti yüzeylerinin XRD paternleri.

Ti üzerindeki *f*MWCNT/HA, *f*MWCNT/Ag-HA, *f*MWCNT/Zn-HA ve *f*MWCNT/Co-HA kaplamalarının mikro yapıları ve kaplamanın enine kesit görüntüsünü Şekil 4.59.'da gösterilmiştir. Ti yüzeyindeki kompozit kaplamalar düzgün ağ yapısı ile tamamen kaplanmıştır ve *f*MWCNT'ler silanize edilmiş Ti yüzeyinde iç içe geçmiş haldedirler. Katkılanmamış HA ve katkılı HA nano tozlarının insan kan plazmasındaki iyon hareketi için makro ve mikro gözenekler sağlayan *f*MWCNT ağ yapısına sarılmış halde oldukları gözlemlenmiştir. Yüzeyindeki gözeneklilik aynı zamanda *f*MWCNT-HA etkileşimi ile oluşturulan hibritin SEM görüntülerinden de görülebileceği gibi yüzey pürüzlülüğünü arttırdığını göstermektedir.

Şekil 4.59.'un ortasına yerleştirilmiş olan kompozit kaplamanın enine kesit morfolojisi kaplama kalınlıkları birbirine yakın olduğundan tek bir arakesit görüntüsünü şeklinde verilmiştir. Ti yüzeyindeki tüm kompozit kaplamaların yaklaşık $\sim 40 \mu m$ kalınlığa sahip oldukları gözlemlenmiştir. Ti yüzeyi boyunca çatlak veya kırılmanın olmadığı homojen kaplamaya ait olan gözenekli kompozit yapısı nedeniyle ilaç yükleme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. HA kristal fazının *f*MWCNT eksenini

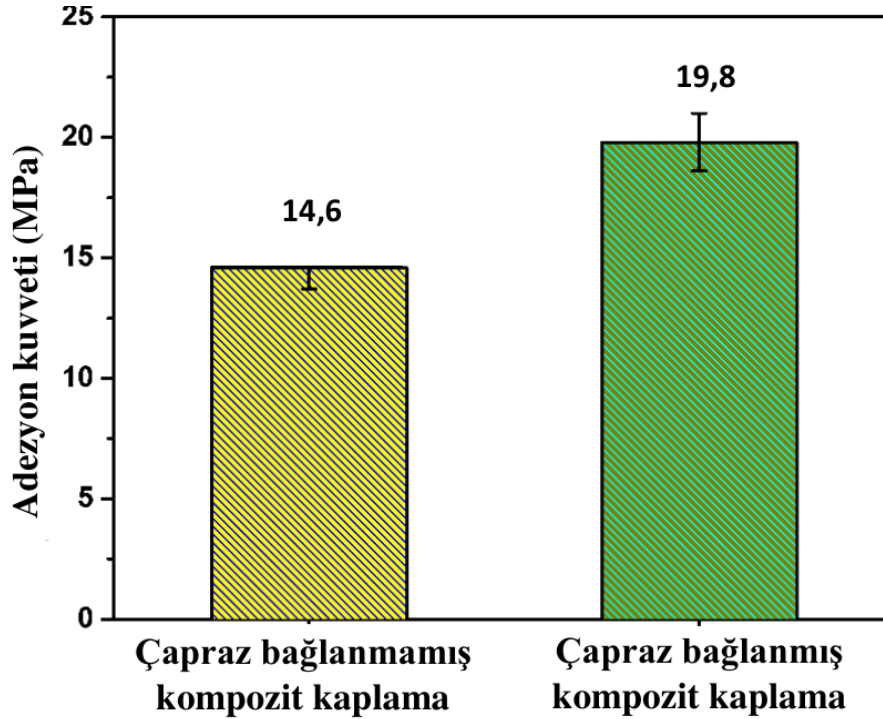
boyunca iyi dağıldığı Şekil 4.59.'da görülmektedir ve bunun çoklu HA kabuklarını ve *f*MWCNT çekirdeği içeren yeni bir fibröz çekirdek-kabuk yapısının oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. Doğal kemiğe yapısal ve içerik olarak sağlanan benzerliklerin Ti yüzeyinin biyolojik ve mekanik özelliklerini artırması beklenmektedir.



Şekil 4.59. (a) *f*MWCNT/HA (b) *f*MWCNT/Ag-HA, (c) *f*MWCNT/Zn-HA ve (d) *f*MWCNT/Co-HA kompozit kaplı Ti yüzeyinin SEM görüntüleri.

Silanize edilmiş Ti substratları üzerindeki çapraz bağlanmamış ve çapraz bağlanmış kompozit kaplamaların yapışma kuvveti Şekil 4.60.'da görülmektedir. Katkılanmış ve katkılanmamış HA içeren kompozit kaplamaların yapışma mukavemeti birbirine yakın ölçüldüğü için her çapraz bağlanmamış ve çapraz bağlanmış kompozit kaplamaların ortalama değeri tek bir değer olarak verilmiştir. Silanize edilmiş Ti substratları üzerindeki çapraz bağlanmış kompozit kaplamaların yapışma mukavemeti ($19,8 \pm 1,2$ MPa) çapraz bağlanmamış kompozit kaplamalardan ($14,6 \pm 0,9$ MPa) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu artış çapraz bağlı olan kompozitin implant yüzeyindeki kaplamanın yapışma kuvvetini arttırmada yardımcı olduğunu göstermektedir. Substrat

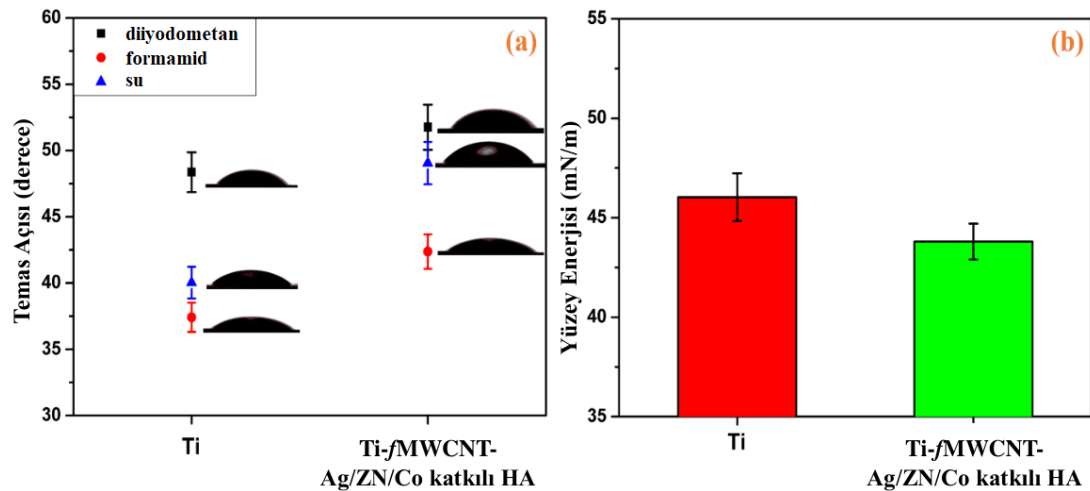
yüzeyinin ve kaplama tabakasının içeriği kompozit kaplamaların bağlanma kuvvetini etkilemektedir. f MWCNT/Ag, Zn veya Co-katkılı HA kompoziti ile silanize Ti substratı arasındaki çapraz bağların oluşturulmasıyla kompozit kaplamaların yapışma mukavemetinin önemli ölçüde geliştirilebileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.60. Silanlanmış Ti substratları üzerindeki çapraz bağlanmamış ve çapraz bağlanmış kompozit kaplamaların yapışma dayanımı sonuçları

Biyomalzeme yüzeyinin biyolojik aktivitesini belirleyen parametrelerden biri olan temas açısı ölçümleri farklı ıslatma sıvıları kullanılarak kaplanmamış ve kaplanmış Ti yüzeylerinde gerçekleştirilmiştir. Ölçülen temas açıları ile farklı ıslatma sıvılarının temas açılarından hesaplanmış olan yüzey enerjileri Şekil 4.61.'de ve Tablo 4.11.'de özetlenmiştir. Tüm numunelerin temas açılarının 90° 'den az olduğu yani hidrofilik davranış gösterdikleri analiz edilmiştir. Suya ait olan teması açıları alkali işlemlili Ti, APTES fonksiyonellendirilmiş Ti ve f MWCNT/Ag, Zn veya Co katkılı HA kaplı Ti yüzeyi için sırasıyla $40,03 \pm 1,2^\circ$; $57,03 \pm 1,5^\circ$ ve $49,05 \pm 1,6^\circ$ olarak ölçülmüştür. Kompozit kaplama işlemi sonrası Ti yüzeyine f MWCNT ile hidrofilik karboksil grubu ve APTES ile -OH grupları kazandırılmıştır. Bu grupların temas açısında bir azalmaya neden olması beklenmesine rağmen yüzeye ait suyla ölçülen temas açısının arttığı görülmüştür. Yüzey pürüzlülüğünün artması ile işlem görmemiş Ti yüzeyine kıyasla

yüzey hidrofiliğinde bir azalmanın olduğu düşünülmektedir. APTES, fMWCNT ve katkılanmamış veya katkılanmış HA içeren kompozit katmanları Ti yüzeylerinin su temas açılarını sırasıyla $40,03 \pm 1,2^\circ$ den $49,05 \pm 1,6^\circ$ ye yükseltmiştir. Katkılanmış ve katkılanmamış HA'ları içeren kompozit kaplamaların temas açıları birbirine yakın ölçüldüğü için her bir kompozit kaplı Ti yüzeyinin ortalama değerleri tek bir değer olarak verilmiştir.



Şekil 4.61. Ti ve fMWCNT/Ag, Zn veya Co katkılı HA kompozit kaplı Ti yüzeylerinde ölçülen (a) Diiodometan, formamid ve su temas açıları ile (b) yüzey enerjileri.

Tablo 4.11. Titanyumun farklı yüzeylerinin temas açıları ile yüzey enerjileri.

Numune	Temas açısı (°)			Yüzey Enerjisi (mN/m)		
	Diiodometan	Formamid	Su	γ_s^d	γ_s^p	γ_s
Ti	$48,36 \pm 1,5$	$37,41 \pm 1,1$	$40,03 \pm 1,2$	35,17	10,86	<u>46,03</u>
Ti/fMWCNT/ Ag, Zn veya Co katkılı HA	$51,75 \pm 1,7$	$42,37 \pm 1,3$	$49,05 \pm 1,6$	33,29	10,51	<u>43,80</u>

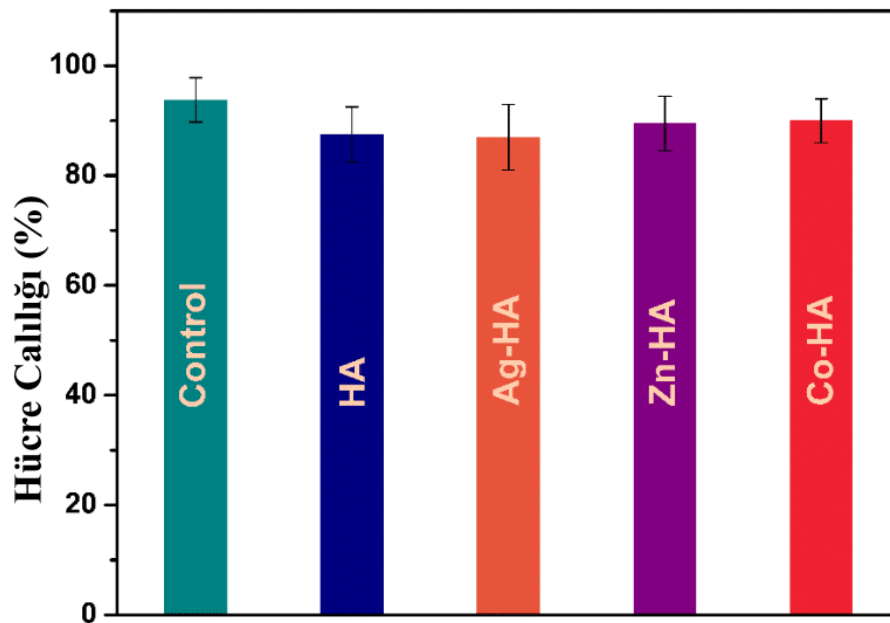
(Not: γ_s^d : dispersion bileşen, γ_s^p : polar bileşen, γ_s : yüzey enerjisi)

(3), (4) ve (5) denklemleriyle hesaplanmış olan yüzey enerjileri Ti için 46,03 mN/m iken kompozit kaplamalar (Ti/fMWCNT/Ag, Zn veya Co-katkılı HA) için 43,79 mN/m'ye düştüğü görülmüştür. Yüksek yüzey enerjisi nano ölçekli parçacıkların oluşturulması için elverişli değilken düşük yüzey enerjisi in-vivo kemik oluşumuna ve çekirdeklenmesine neden olan nano boyutlu apatit parçacıklarının oluşumuna katkı sağlayabilir. 20-30 mN/m arasında olan yüzey enerjisi değerleri minimum hücre biyoadesyonuna sahiptir ve bu değerlerin üzerindeki yüzey enerjileri daha yüksek bir

biyoadezyon gösterme eğilimindedirler [271, 272]. Kompozit kaplı Ti numunelerinin yüzey enerjileri biyolojik açıdan daha iyi biyoadezyon sağlayan değer olarak 30 mN/m'nin üstünde bulunmuştur

Sonuç olarak f MWCNT, Ag, Zn veya Co katkılı HA ve katkılanmamış HA'dan meydana gelen yeni hidrofilik yüzey hibritinin Ti substrat yüzeyinin biyolojik özelliklerini artırması beklenmektedir.

Katkılamaların hücreler üzerine etkilerinin değerlendirildiği MTT analiz sonuçları Şekil 4.62.'de gösterilmiştir. Pozitif kontrol grubuna kıyasla sentezlenen tüm HA'ların hücre canlılığını azaltan belirli bir ölçüdeki sitotoksositeye sahip oldukları analiz edilmiştir. Bununla birlikte hücre canlılığı açısından katkılanmış ve katkılanmamış HA'lar arasında önemli bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Düşük miktarlarda Ag [51], Zn [59, 273] ve Co [60] birleşimlerinin hücelere zararlı olmadığı bilinmektedir ve MTT sonuçları katkılanmış ve katkılanmamış HA'ların MG-63 hücreleri üzerinde toksik etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Kabul edilebilir biyoyumluluklarından dolayı biyomedikal uygulamalarda kullanmak amacı ile sentezlenen HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA tozlarından kompozit hazırlanmasının uygun olduğu görülmüştür.



Şekil 4.62. HA, Ag-HA, Zn-HA ve Co-HA'nın MTT analizi ile hücre değerlendirme sonuçları (n = 3).

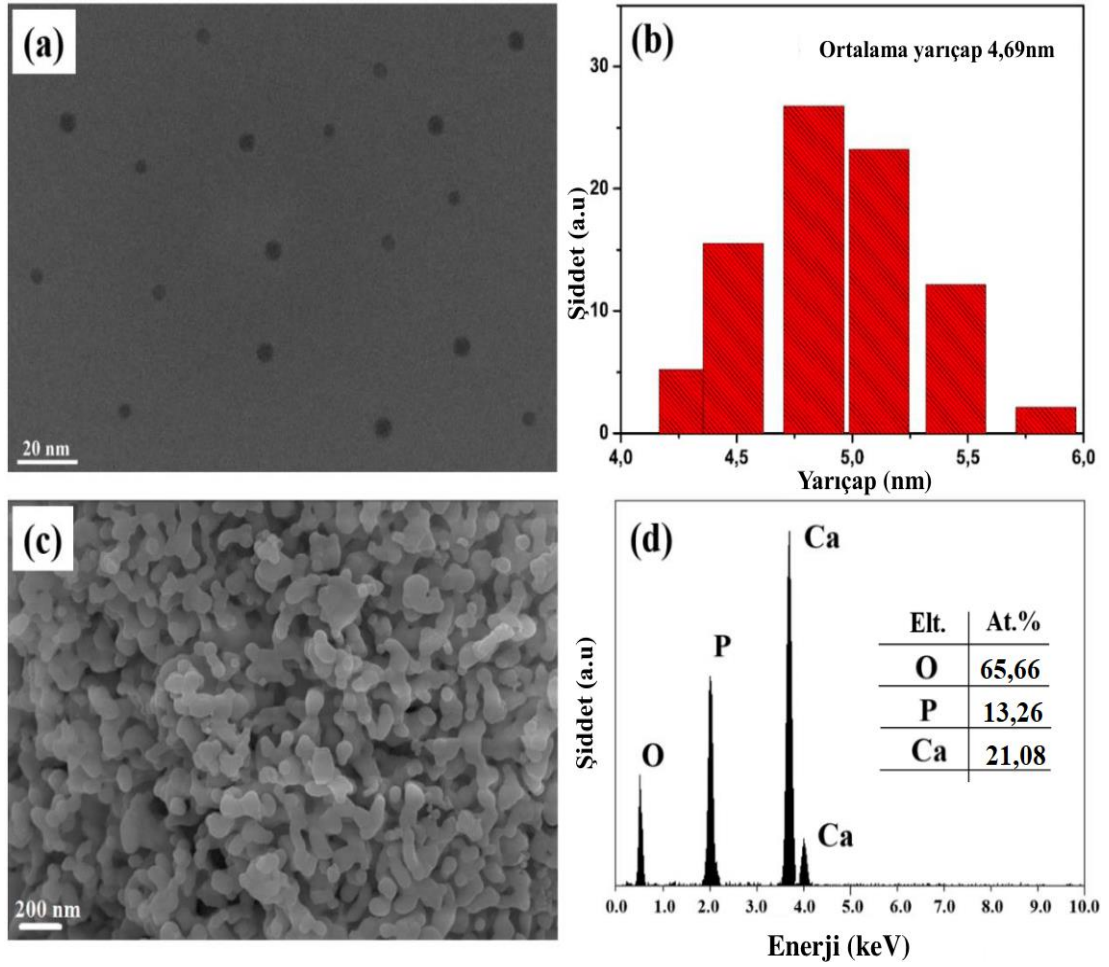
4.8. Kanser Tedavisine Yönelik Uyarana Duyarlı Akıllı İlaç Dağıtım Sistemi Olarak NCQDs Bazlı Enjektelerde Edilebilir, Kendiliğinden Çapraz Bağlanan ve Yerinde Oluşan Yeni Çok Fonksiyonlu Hidrojel Çalışması

Sentezlenen NCQDs'nin morfolojinin ve büyüklüğünün incelendiği TEM analizi Şekil 4.63.'de verilmiştir. Düzenli küresel şekilli morfolojiden oluşan ve 10 nm'den küçük boyuta sahip olduğu, sentez sırasında topaklanmanın meydana gelmediği ve çözelti içinde iyi dağıtılmış olduğu Şekil 4.63.a'dan analiz edilmiştir.

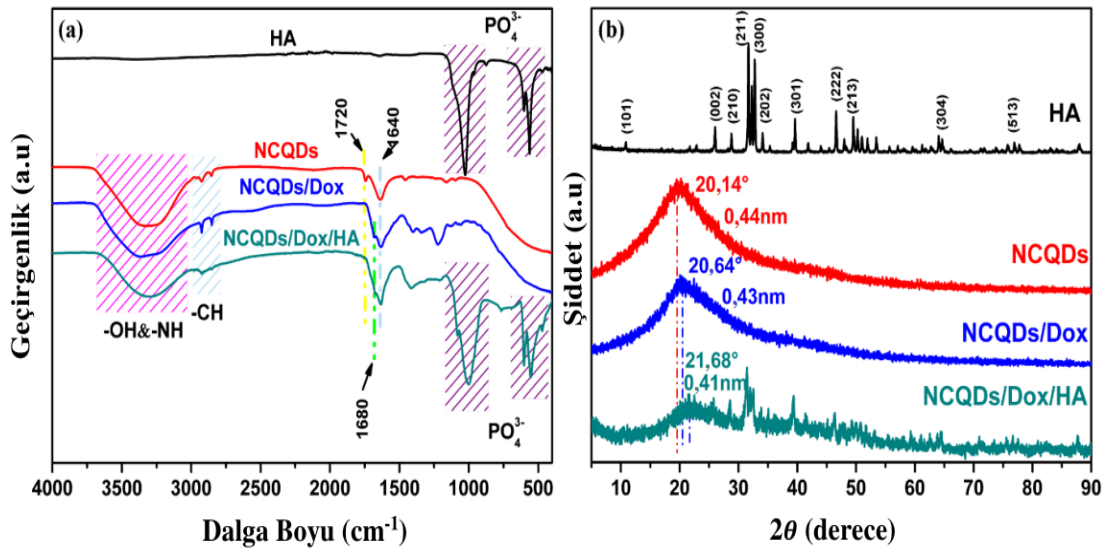
TEM görüntülerinden elde edilen ve Gauss dağılımına uyan partikül boyut histogramı Şekil 4.63.b'de görülmektedir. TEM gridi üzerinde monodispers edilmiş NCQDs'nin homojen ve nispeten dar boyut dağılımını doğrular şekilde çapları 4-6 nm aralığında ve boyut dağılımından hesaplandığı gibi ortalama ~4,69 nm olduğu gözlemlenmiştir. Literatüre bakıldığında bu çalışmada elde edilen sonuçlar glikoz [274] ve sitrik asit [275] ile üretilen NCQDs çaplarına benzerdir fakat ipekten üretilen yaklaşık 62 nm çapındaki NCQDs'lardan [276] küçük olduğu görülmüştür.

HA nanopartiküllerinin morfolojisi ve elementel analizi sırasıyla Şekil 4.63.c ve d'de gösterilen FESEM ve EDS analizleri ile karakterize edilmiştir. Saf HA nanopartiküllerine ait FESEM görüntüsü düzensiz veya küresel şekilli HA nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde elde edildiğini ve nHA'nın ortalama boyutunun yaklaşık 60-100 nm aralığında olduğunu göstermektedir. Şekil 4.63.d'de gösterilmiş olan HA elementel analizine bakıldığında sadece kalsiyum (Ca), fosfor (P) ve oksijen (O) elementlerinin bulunduğu ayrıca Ca/P oranının 1,59 olduğunu görülmektedir.

Tüm deneysel numune gruplarındaki bileşenlerin ağırlık/hacim oranları Tablo 3.6.'da listelenmiştir. Şekil 4.64.a'da gösterildiği gibi NCQDs, NCQDs/Dox, NCQDs/Dox/HA ve HA'nın yüzey fonksiyonel gruplarını doğrulamak için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. HA'ya ait karakteristik pikler olan tetrahedral fosfat (PO_4^{3-}) grubunun asimetrik gerilme, bükülme modu ve antisimetrik gerilme iç titreşimlerine ait pikler 890-1180 ve 490-610 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir.



Şekil 4.63. NCQDs'nin (a) TEM görüntüsü, (b) parçacık boyutu dağılımının histogramları, HA'nın (c) FESEM görüntüsü ve (d) EDS analizi.



Şekil 4.64. (a) NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın FTIR spektrumları, (b) HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın XRD paternleri.

NCQDs spektrumundaki 3405 cm^{-1} 'deki geniş emilim piki O–H ve N–H asimetrik gerilme modlarına; $2800\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler –CH gruplarına; 1720 cm^{-1} 'deki pik C=O gerilme titreşimlerine ve 1640 cm^{-1} 'deki pik C=C gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1456 cm^{-1} , 1152 cm^{-1} ve 1097 cm^{-1} 'deki küçük geniş bantlar NCQDs'ye ait C-N gruplarının titreşimlerini göstermektedir [274]. Bu sonuçlar NCQDs'nin yüzeyinde -NH_2 , -OH ve -COOH dâhil olmak üzere çeşitli azot ve oksijen içeren fonksiyonel grupların varlığını göstermektedir. NCQDs/Dox'a ait FTIR spektrumunda 1230 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı C–O (epoksi) grubuna ve 1680 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı Schiff bazı reaksiyonunun meydana geldiğini gösteren C=N grubuna karşılık gelmektedir. Literatürle uyumlu olarak [277] NCQDs aldehit grubuna ait olan 1720 cm^{-1} 'deki küçük simetrik titreşim bandının Schiff bazı oluşturmak için kovalent olarak bağlanma sonrası kaybolduğu görülmüştür.

Şekil 4.64.b'de gösterildiği gibi HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın kristal yapıları ve faz bileşimleri XRD ile analiz edilmiştir. $10,91^\circ$, $25,86^\circ$, $28,41^\circ$, $31,77^\circ$, $32,91^\circ$, $34,11^\circ$, $39,79^\circ$, $46,66^\circ$, $49,45^\circ$, $64,09^\circ$ ve $77,08^\circ$ 'deki sırasıyla (101), (002), (210), (211), (300), (202), (301), (222), (213), (304) ve (513) kırınım düzlemlere karşılık gelen piklerin ICDD No. 009-0432 olan HA'nın örgü düzlemi [7] ile uyumlu olduğu görülmüştür. CaCO_3 veya $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 'ye ait piklerin XRD paternlerinde yer almaması sentezlenen HA'nın tek faz olduğunu göstermektedir. NCQDs'nin XRD paterninde $20,14^\circ$ civarında görülen geniş kırınım piki amorf fazdaki NCQDs'nin $0,44\text{nm}$ kafes aralığına sahip olduğunu göstermektedir [186]. Bu geniş pik düzensiz karbon atomlarından oluşan NCQDs'nin azot ve oksijen içeren gruplarından dolayı yapısında olan yüzey kusurlarına atfedilebilir. NCQDs ve NCQDs/Dox numunelerinin kırınım pikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. NCQDs/Dox paterninde keskin piklerin olmaması Dox'un amorf formda NCQDs/Dox yapısına başarıyla dağıtıldığını ve kapsüllendiğini göstermektedir.

NCQDs/Dox/HA numunesinin XRD paterninde $21,67^\circ$ 'de gözlemlenen NCQDs'nin karakteristik zirvesi dışında HA'nın XRD paternine benzer olduğu görülmüştür ve NCQDs/Dox ile NCQDs/HA arasındaki olası bağlarla NCQDs yüzeyindeki zengin aktif sahalar genişletilmiştir. NCQDs'nin HA nanopartikülleri üzerinde birikmesi ve

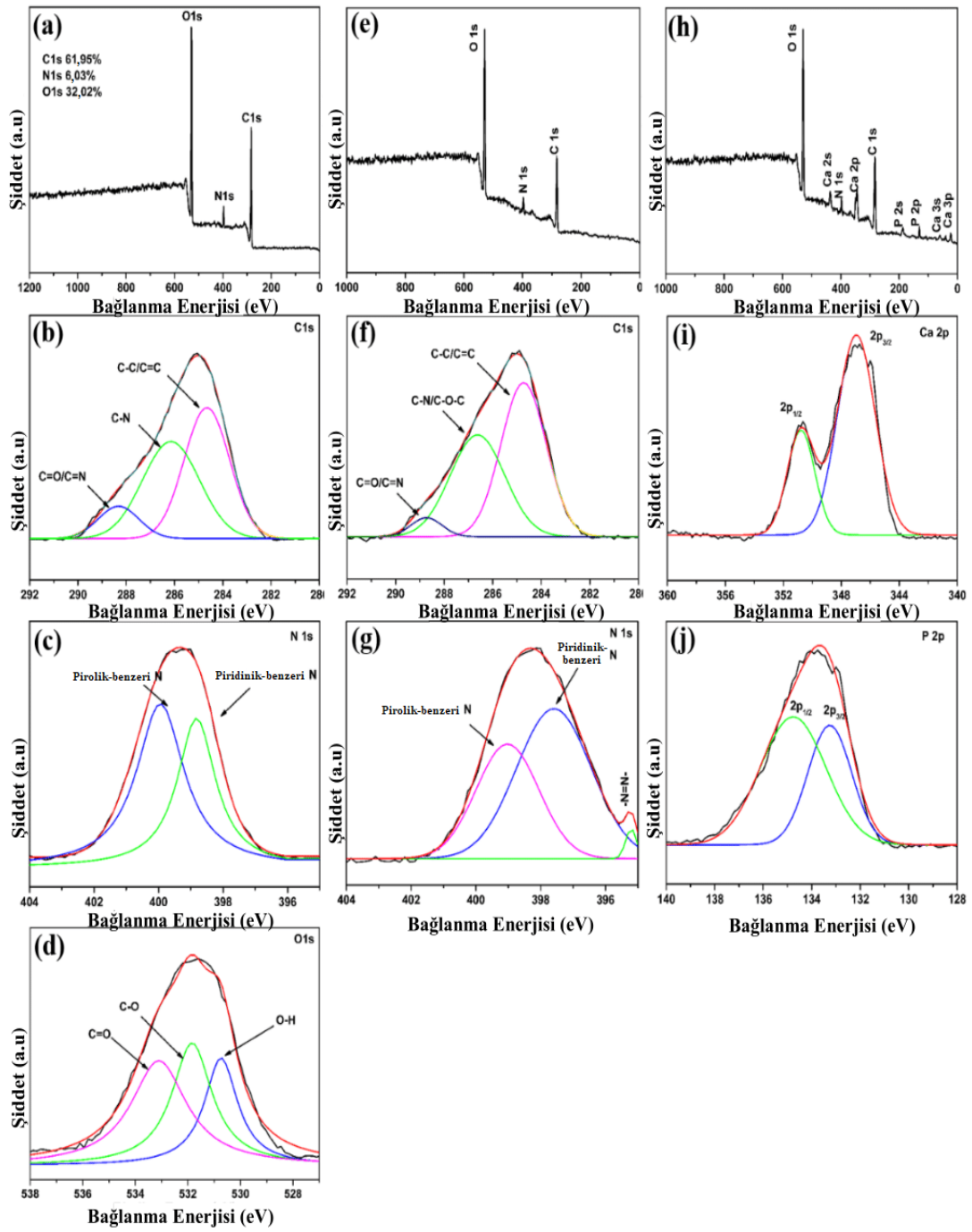
hafifçe azaltılmış d-aralığı nedeniyle HA'nın XRD paterninin daha yüksek açılara doğru küçük bir kaymaya sahip olduğu düşünülmektedir. Örgü aralıklarının NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA için sırasıyla 0,44 nm'den 0,43 nm ve 0,41 nm'ye daraldığı görülmüştür ve bu aralıktaki kafes daralmasının nano ölçekli malzemeler için yaygın olduğu bilinmektedir. Kristalliğinin HA yüzeyi üzerindeki NCQDs ve Dox tarafından değiştiğinden dolayı konjuge NCQDs/Dox/HA'daki HA zirvelerinin saf HA'ninkinden daha zayıf olduğu düşünülmektedir.

NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'ya ait yüzey fonksiyonel gruplarının incelendiği genel XPS spektumlarının sonuçları ile C 1s, N 1s, O 1s, Ca 2p ve P 2p bölgelerinin yüksek çözünürlüklü çekirdek seviye XPS spektrumlarının sonuçları Şekil 4.65.'de gösterilmiştir. Çekirdek seviyelerine fitlemek için en küçük kareler yöntemi ile Gauss ve Lorentzian pikleri kullanılmıştır.

284,8 eV'deki C1s, 399,2 eV'deki N 1s ve 531,2 eV'deki O1s piklerini gösteren Şekil 4.65.a'daki spektrum NCQDs'nin C, N ve O elementlerinden oluştuğunu göstermektedir. Kantitatif XPS analizi ile C, N ve O'nun yüzeydeki atomik oranları sırasıyla %61,95, %6,03 ve %32,02 olarak bulunmuştur ve yüzeyde bulunan azot varlığını doğrulamaktadır. C1s, N1s ve O1s bölgelerinin yüksek çözünürlüklü taramaları Şekil 4.65.b-d'de gösterilmiştir.

NCQDs'nin C1s spektrumu 284,88 eV'deki C=C veya C-C; 286,00 eV'deki C-N ve 288,2 eV'deki C=O veya C=N'a karşılık gelen üç ana bileşen göstermektedir [278]. Bu sonuç FTIR spektrumu ile uyumlu olarak sentezlenen N-katkılı CQDs yüzeylerinin hidroksil ve karboksil grupları açısından zengin olduğunu göstermektedir.

286,00 eV bağlanma enerjisindeki pik FTIR sonuçları ile uyumlu olarak amid gruplarının varlığına işaret etmektedir. Şekil 4.65.c'deki NCQDs'nin N 1s spektrumu azotun kovalent bağlanma yoluyla karbona bağlı olduğunu gösteren piridinik ve pirolitik benzeri [278] azot varlığını doğrulayan 399,1 eV ve 400,8 eV'de iki pik sergilemiştir.



Şekil 4.65. (a) NCQDs'nin XPS spektrumu; (b – d) NCQDs'nin yüksek çözünürlüklü C 1s, O 1s ve N 1s spektrumları; (e) NCQDs/Dox'un XPS spektrumu; (f-g) NCQDs/Dox'un yüksek çözünürlüklü C 1s ve N 1s spektrumları; (h) NCQDs/Dox/HA'nın XPS spektrumu; (i, j) NCQDs/Dox/HA'nın yüksek çözünürlüklü Ca 2p ve P 2p spektrumları.

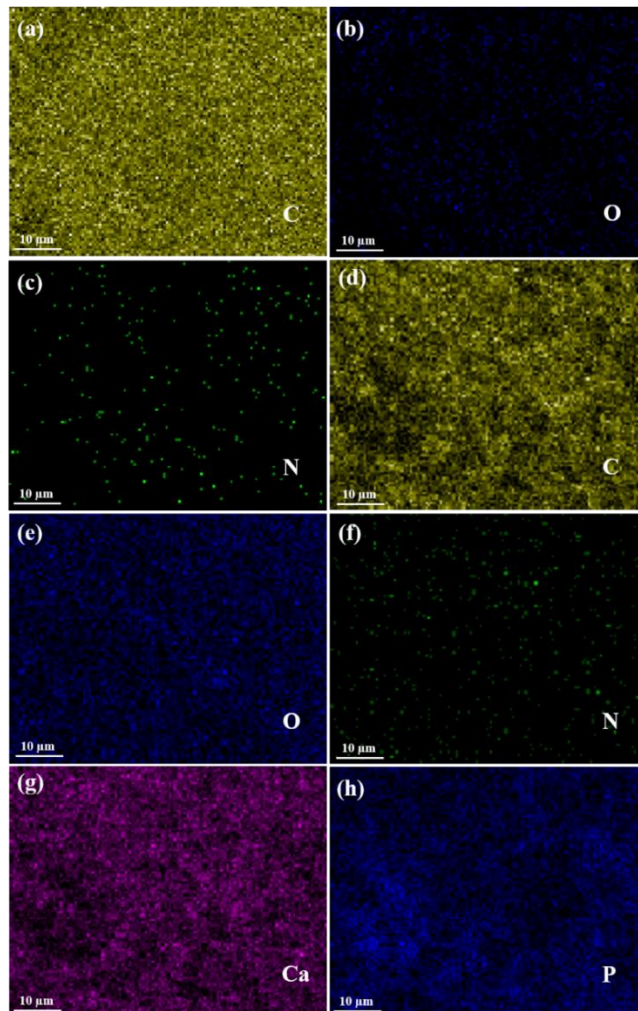
Şekil 4.65.d'de gösterilmiş olan NCQDs'nin yüksek çözünürlüklü O 1s spektrumunda 530,8 eV, 531,9 eV ve 533,1 eV bağlanma enerjilerinde sırasıyla O–H, C–O ve C=O varlığını gösteren üç bağlanma piki gözlemlenmiştir [279] ve bu sonuçlar NCQDs'nin oksijen ve azot atomları açısından zengin olduğunu göstermektedir. NCQDs/Dox için

elde edilen C1s, N1s çekirdek seviye XPS spektrumları Şekil 4.65.e-g'de sunulmaktadır. 284,72 eV ve 286,6 eV'deki pikler sırasıyla Dox'un hafif bir kaymaya sahip olan $-C=C/C-C$ ve $-C-N$ veya $-C-O-C-$ bağlarını ile ifade etmektedir [280]. 399,3, 397,7 ve 395,3 eV'da ortaya çıkan ve sırasıyla piridinik benzeri, pirolük benzeri ve $-N=N-$ bağı oluşumuna karşılık gelen N1s pikleri çeşitli azot varlığını göstermektedir. Dox'un elektron yoğunluğunun transferi ile NCQDs'ye bağlanması N 1s'lerin pik konumunun birkaç eV ile azaltması beklenebilir. Dox molekülünün zengin karbon-karbon ve karbon-oksijen-karbon bağları nedeniyle NCQDs/Dox'un $C-C/C=C$ ve $C-N/C-O-C$ yoğunluğu NCQDs ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmaktadır. NCQDs'ye kıyasla NCQDs/Dox'un atomik karbon yüzdesinde artış ve atomik azot yüzdesinde azalmanın olduğu gözlemlenmiştir. Bu farklılığın NCQDs'nin azot oranının Dox moleküllerinden daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 4.65.h'de, HA'nın sırasıyla P2p, Ca2p [281] bağlanma enerji değerlerine karşılık gelen 134 eV ve 347 eV'de ilave pikler gözlemlenmiştir. Yüksek çözünürlüklü XPS spektrumunda 2p kalsiyum ve fosfor orbitallerine karşılık gelen tepe noktasının altındaki alan kullanılarak Ca/P oranını hesaplanmış ve Ca/P oranı HA'nın teorik oranına (1,67) yakın olarak Ca/P=1,61 olarak bulunmuştur. NCQDs/Dox/HA numunesi için Ca ve P spektrumları Şekil 4.65.i-j'de gösterilmiştir. Sırasıyla 351,0 ve 347,1 eV'deki iki pike karşılık gelen $2p_{1/2}$ ve $2p_{3/2}$ 'ye ayrılan yüksek çözünürlüklü Ca 2p spektrumu HA üzerindeki kalsiyum ile ilişkilidir. Ca $2p_{3/2}$ ile ilişkili 347,3 eV civarında görülen pikten kalsiyum atomlarının fosfat gruplarına (PO_4^{3-}) bağlandığı anlaşılmaktadır.

Şekil 4.65.j'de gösterilen yüksek çözünürlüklü P2p spektrumu da sırasıyla bağlayıcı enerjileri 134,5 eV ve 133,3 eV olan $2p_{1/2}$ ve $2p_{3/2}$ seviyeleri için spin orbite bölünen iki tepe noktası literatürle uyumlu olarak karakterize edilmiştir [282]. Gözlemlenen Ca ve P spektrumlarındaki piklerin tümü HA oksidasyon durumları (Ca^{2+} ve P^{5+}) için karakteristiktir. Ek karakterizasyon olarak NCQDs ve NCQD/Dox ve NCQD/Dox/HA konjüгатlarının zeta potansiyeli, DLS ve UV-Vis absorpsiyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

NCQDs ve HA oluşumları ayrıca Şekil 4.66.'de gösterildiği gibi yerinde jelleşmiş ve liyofilize NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA için elementel haritalama analizi gerçekleştirilerek karakterize edilmiştir. Şekil 4.66.a-c.'de verilen NCQDs/Dox'a ait element haritalama analizi karbon, oksijen ve azotun varlığını gösterirken Şekil 4.66.d-h'da verilen NCQDs/Dox/HA'ya ait element haritalama analizi karbon, oksijen, azot, kalsiyum ve fosfor elementlerinin varlığını göstermiştir. Bu sonuç [283]'te olduğu gibi NCQDs/Dox'ta N varlığını ve NCQDs/Dox/HA'da HA varlığını doğrulamaktadır. Haritalama sonuçları hidrojel içindeki C, O, N, Ca ve P atomlarının homojen dağılımını göstermekte ve XPS verileri ile uyumlu olarak NCQD/Dox'un nHA'lar ile konjugasyonunu doğrulamaktadır.



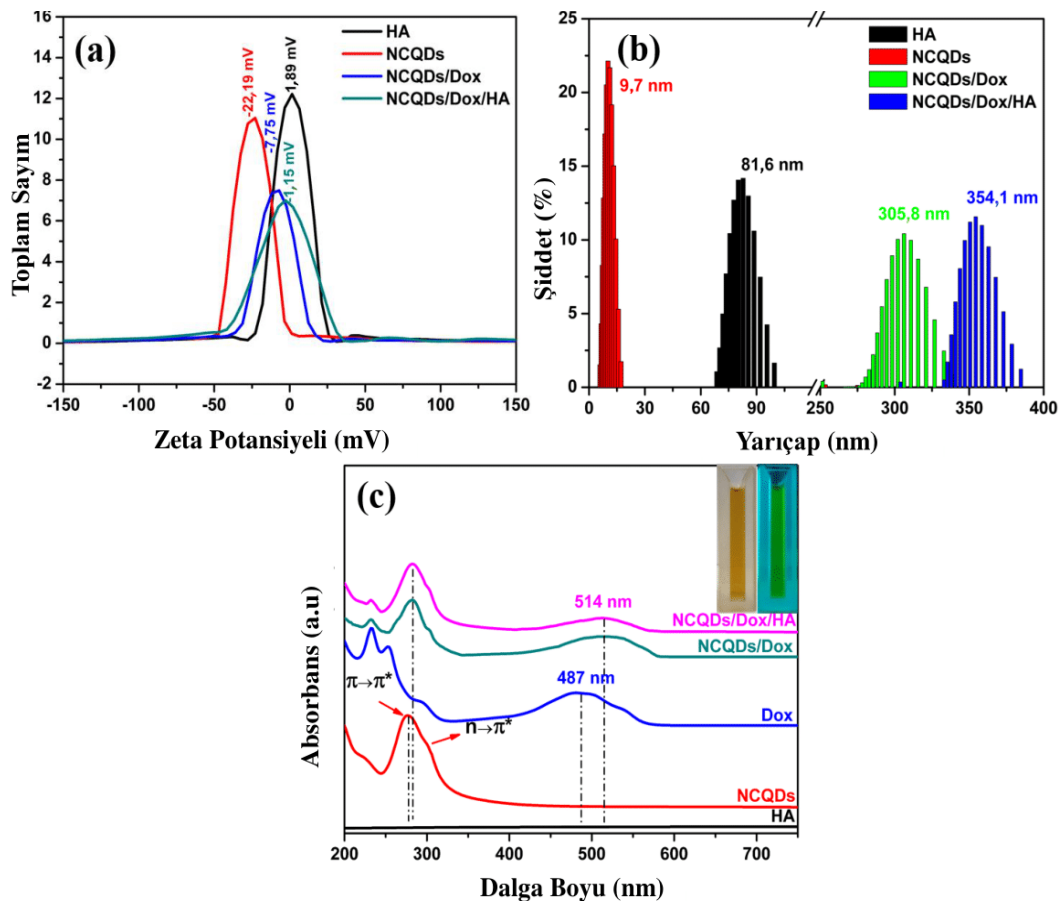
Şekil 4.66. Hazırlanan NCQD/Dox'ta (a) karbon, (b) oksijen ve (c) azotun elementel haritalaması, hazırlanan NCQDs/Dox/HA'da (d) karbon, (e) oksijen, (f) azot, (g) kalsiyum ve (h) fosforun elementel haritalaması.

NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA konjüгатlarının zeta potansiyel ölçümlerini Şekil 4.67.a'da gösterilmiştir. Yüzeğe yayılan karboksil ve negatif yüklü iyonize hidroksil fonksiyonel grupları nedeniyle daha önce bildirilen verilerle [284] oldukça benzer olarak NCQDs'nin zeta potansiyeli $-22,19$ mV olarak ölçülmüştür. Bu zeta potansiyeli sonucu Dox taşıyıcı olarak in-vivo anti-tümör hücre testlerinde kullanılmak üzere uygun negatif yüke ve negatif yüzey polaritesine sahip olduğu anlamına gelmektedir. Dox yüklemesi ile NCQDs'nin ζ potansiyelinin $-22,19$ mV'den $-7,75$ mV'ye yükselmesi Dox'un NCQD/HA yapısına katıldığını doğrulamaktadır ve Dox ilavesi sonrası benzer değişikliklere literatürde rastlanmaktadır [285]. Dox tetrakasyonik bir porfirin olduğundan pozitif yüklü serbest aminleri nedeniyle hem hidrofilik-hidrofilik hem de elektrostatik etkileşim yoluyla NCQDs'ye yüklenebilir. Dox'un NCQDs ile konjügasyonunun ardından NCQD/Dox nanojelinin negatif yüzey yükü tüm karboksilik gruplarının işgal edilmemesinin bir sonucu olarak kalan karboksilik gruplarına atfedilebilir. Negatif yük nanojelin stabilize edilmesine yardımcı olabilir ve retiküloendotelial sisteme alınmasını önlemek için hidrofilik bir yüzey sağlar [286].

pH 7,4'te pozitif zeta potansiyeline ($+1,89$ mV) sahip HA kolloidlerinin aksine NCQDs/Dox/HA negatif zeta potansiyeli ($-1,15$ mV) göstermiştir. Bu negatif yüzey değişikliğinin kan bileşenleri ile etkileşimleri azalması nedeniyle nanopartiküllerin kan uyumluluğunu ve dolaşım süresini uzatacağı düşünülmektedir. NCQDs/Dox/HA zeta potansiyel değerinde pozitif zeta bölgesine doğru olan kayma HA varlığındaki yüzey yükü nötralizasyonunu göstermektedir. Her bir adımda gözlemlenen yüzey yükü değişiklikleri NCQDs/Dox/HA'nın başarılı sentezine işaret etmektedir.

Şekil 4.67.b'de gösterildiği gibi HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA numunelerinin ortalama hidrodinamik çaplarının sırasıyla $81,6$ nm, $9,7$ nm, $305,8$ nm ve $354,1$ nm olduğu DLS tekniği ile bulunmuştur. DLS ile ölçülen NCQDs hidrodinamik boyutlarının TEM analizinden elde edilen boyutlardan daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. Bu boyut farklılığının olası nedeninin DLS tekniğindeki su moleküllerinin varlığı olduğu literatürde verilmiştir [287]. Büyük olasılıkla kümelenmiş yapıların oluşması nedeniyle Dox konjügasyonunun ardından

NCQDs/Dox'un ortalama boyutu hazırlanan NCQDs'ninkinden daha büyük olarak 305,8 nm'ye ulaşmıştır ve bu durum yukarıda bahsedilen azalan zeta potansiyel sonuçlarını doğrulamaktadır. Ayrıca NCQDs/Dox/HA numunesine ait DLS ölçümlerinde daha büyük bir agrega popülasyonu gözlenmiştir. Sadece tümör dokusunda meydana gelen gelişmiş geçirgenlik ve retansiyon (EPR) etkisi yaygın bilinen bir olgudur. Tümör damarları yeterli besin ve oksijen kaynaklarını elde etmek ve hızlı büyümek için normal dokulara göre daha geniş olduğundan dolayı normal dokularinkine kıyasla daha büyük boyutlu parçacık tümör dokularına serbestçe girebilir ve birikebilir. Çapı 10 nm'den küçük olan parçacıklar ekstravazasyonlar ve renal klerens ile hızlı bir şekilde uzaklaştırıldığından dolayı [288] NCQDs/Dox/HA'nın mevcut boyut dağılımının EPR etkisinden yararlanan ilaç taşıyıcı sistemler için ideal olduğu düşünülmektedir.



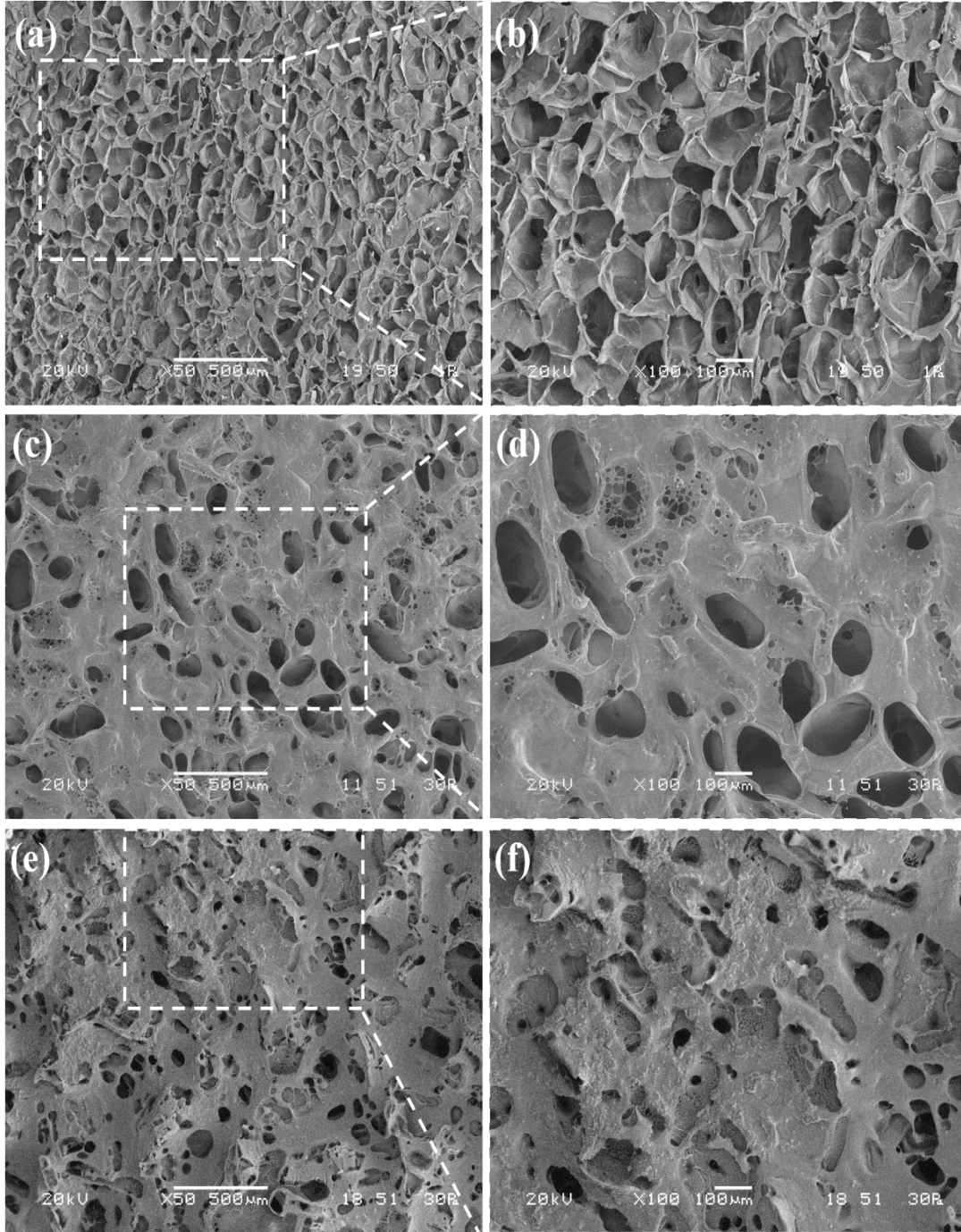
Şekil 4.67. (a) ζ HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA potansiyeli, (b) HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın hidrodinamik çapı, (c) sulu çözeltilerde HA, NCQDs, Dox, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın UV-Vis absorpsiyon spektrumu. Ek, gün ışığı altında (solda) ve 365 nm UV ışınıyla (sağda) ışılanan NCQDs dispersiyonunun fotoğraflarını gösterir.

NCQDs, Dox, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA numunelerine ait nötr pH'da kaydedilen UV-Vis absorpsiyon spektrumları Şekil 4.67.c'de gösterilmektedir. Sulu HA çözeltisi UV-Vis bölgesinde herhangi bir absorpsiyon bandı göstermez iken NCQDs spektrumunda 275 nm'de güçlü bir tepe ve 307 nm civarında zayıf bir omuz bandı tespit edilmiştir. Bu iki absorbans piki NCQDs yapısındaki azot grubunun bağlanmayan elektronlarının ve karbonil veya C=C bağının sırasıyla $\pi-\pi^*$ ve $n-\pi^*$ geçişlerine atfedilmiştir. Azotun elektron veren doğası ile çekirdekdeki konjugasyon derecesini arttırdığından dolayı $\pi-\pi^*$ ve $n-\pi^*$ geçişlerinde N-içermeyen CQDs'a kıyasla kırmızıya kayma gözlenmiştir [289] ve bu sonuç ayrıca NCQDs oluşumunu göstermektedir. NCQDs ve NCQD/Dox'un UV-Vis spektrumları karşılaştırıldığında 275 nm'deki absorpsiyon bandınının 282 nm'ye kırmızıya doğru kayması bu bandın Dox ve NCQDs konjugasyonundan etkilendiğini açıkça göstermektedir.

Dox'un UV-Vis spektrumunda 487 nm civarında görülen [11] karakteristik absorpsiyon pikinin NCQDs/Dox'un hibritine ait spektrumda da görülmesi Dox molekülünün yapıya dâhil edildiğini göstermektedir. NCQDs/Dox spektrumundaki bu absorpsiyon piki Dox spektrumundaki ile karşılaştırıldığında Dox konjuge NCQDs için ~20–30 nm yer değiştirmiş olduğu görülmüştür. Absorpsiyon tepe noktasındaki kırmızı kaymanın muhtemelen Dox'un NCQDs ile hidrofilik etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir ve elde edilen bu gözlemler Dox'un NCQDs ile başarılı bir şekilde konjugasyonunu desteklemektedir. NCQDs (0,5 mg/mL) sulu süspansiyonu gün ışığı altında kahverengimsi sarı renk (Şekil 4.67.c'de solda) gösterirken 365 nm'lik UV ışık altında NCQDs kenar etkisi ve kuantum hapsinden kaynaklanan parlak okyanus yeşili ışıldama (Şekil 4.67.c'de sağda) göstermektedir. UV lamba altında çıplak gözle kolayca görülebilen seyreltik sulu çözeltideki parlak yeşil renkte elde edilen lüminesans NCQDs'nin başarılı oluşumunu teyit etmektedir.

Liyofilize edilmiş ve dikey olarak kesilmiş hidrojelin içsel morfolojileri SEM ile karakterize edilmiştir ve Şekil 4.68.'de gösterildiği gibi üretilen jellerin farklı yüzey morfolojilerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. SEM analizi kesitsel olarak hazırlanan NCQDs'un (Şekil 4.68.a-b), NCQDs/Dox'un (Şekil 4.68.c-d) ve NCQDs/Dox/HA'nın (Şekil 4.68.e-f) dış gözenekli yapısının karakterizasyonu için gerçekleştirilmiştir. Tüm

hidrojellerin sürekli ve birbirine bağlı mikron büyüklüğünde gözenekli üç boyutlu yapı sergiledikleri gözlemlenmiştir. Bu birbirine bağlı iç kanal sistemi hücre yapışmasını ve çoğalmasını, oksijen ve besin taşınmasını sağladığı ve metabolik atık difüzyonunu kolaylaştırdığı için önemli bir parametredir [290].



Şekil 4.68. Liyofilize hidrojellerin morfolojisi: (a-b) NCQDs'nin, (c-d) NCQDs/Dox ve (e-f) NCQDs/Dox/HA hidrojellerinin SEM görüntüleri.

Oksijen içeren fonksiyonel gruplardan ve $-NH_2$ ile $-OH$ arasındaki bağlanmadan kaynaklan elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları ve Schiff bazı reaksiyonları sayesinde fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı 3B poroz ağ yapısını üretilmiştir. NCQDs ve NCQDs/Dox/HA sırasıyla 20-150 μm ve 20-50 μm aralığında ortalama çapta küresel şekilli gözeneklere sahipken aksine 1-200 μm gözenek boyutuna sahip NCQDs/Dox yapısında düzensiz gözeneklilik gözlemlenmiştir.

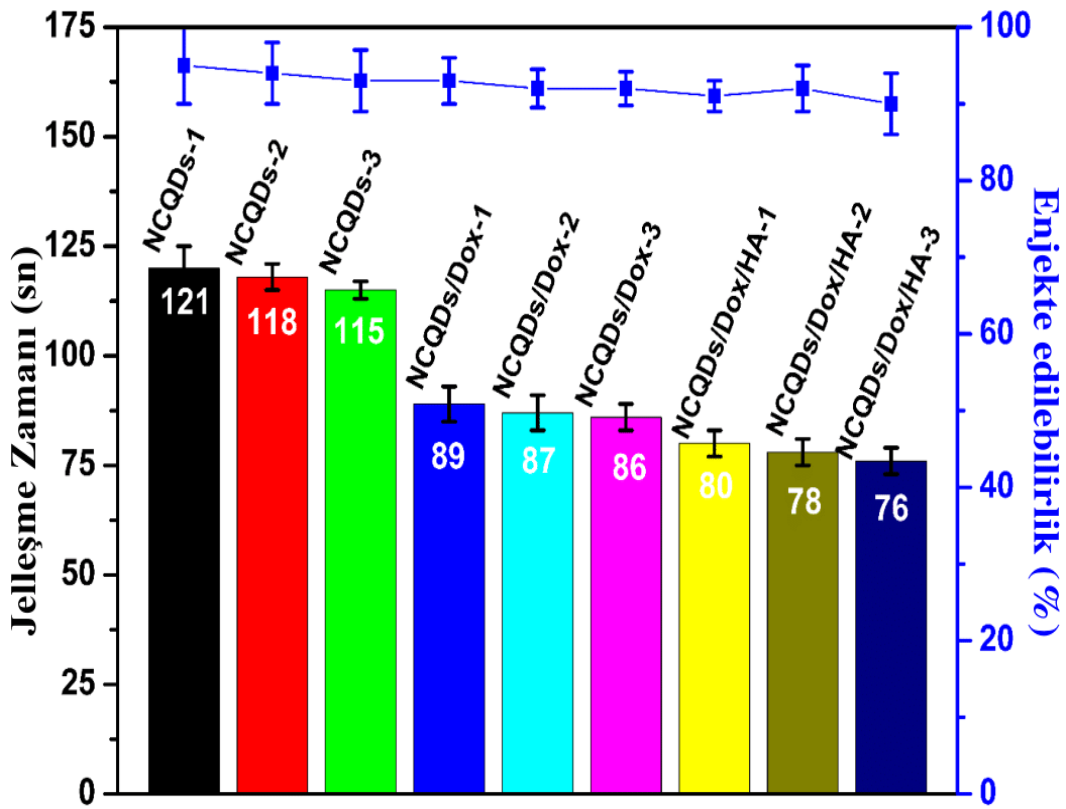
Küçük boyutlu NCQDs'nin açıkça görülememesine rağmen Şekil 4.68.a-b'de verilen SEM görüntülerinden NCQDs hidrojenlerinin homojen dağıtılmış ve tek tip gözeneklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 4.66.'da verilen NCQDs'nin element haritalamasından açıkça görüleceği gibi NCQDs/Dox/HA hidrojel ağı içinde homojen bir dağılım sergilediği gözlemlenmiştir. Hidrojellerde bulunan hidrofilik kısımların artması nedeniyle NCQDs/Dox hidrojenlerine ait SEM görüntüleri Dox ilavesiyle gözenek boyutunun arttığını göstermekte ve Dox'un NCQDs'ye bağlanmasını doğrulamaktadır. Düzenli gözenekliliği nedeniyle elde edilen NCQDs/Dox/HA daha önce bildirilmiş olan diğer NCQDs bazlı hidrojenlerden [291] daha avantajlı olduğu gözlemlenmiştir. Dox'un NCQDs ağına güçlü bağlanma kapasitesi ilacın sürekli salınımını kolaylaştırmak için önemlidir.

Şekil 4.68.e-f'de verilmiş olan HA ilavesinden sonraki SEM görüntüleri yapısal bozulma olmadığını ve düzgün mikro gözenekli yapıların elde edildiğini göstermektedir. Hidrojelin daha yüksek çapraz bağlanma yoğunluğu ve buz kristallerinin çekirdeklenme alanlarının sayısını arttırmasından dolayı hidrojele ait ortalama gözenek boyutunun HA ilavesiyle azaldığı gözlemlenmiştir.

Hidrojel ağının gözenekliliğinin ve kesitsel morfolojisinin HA ve Dox miktarlarının NCQD's miktarına oranlarının değiştirilmesiyle ayarlanabileceği analiz edilmiştir. Şekil 4.68.f'de verilmiş olan yüksek büyütme oranlı ($\times 100$) SEM görüntüsünden hidrojenler içindeki nHA'nın aglomere olmamış homojen dağılımı, gözenekler arasında da yer aldığı ve dış yüzey pürüzlülüğünün arttırdığı literatüre benzer şekilde [292] gözlemlenmiştir.

Şekil 4.68.a-b ve c-d’de gösterildiği gibi NCQDs ve NCQDs/Dox hidrojelindeki pürüzsüz dış yüzeyin aksine, HA’nın NCQDs/Dox jellerine dâhil edilmesi içyapıyı NCQDs ve NCQDs/Dox hidrojellerinden biraz daha pürüzlü hale getirmektedir. Şekil 4.66.’da verilen elementel haritalama sonuçlarına göre HA’nın agregasyon olmadan NCQDs/Dox içinde eşit olarak dağıldığı gözlemlenmiştir.

Enjekte edilebilen hidrojelın harici bir müdahale olmaksızın insan vücuduna pratik şekilde uygulanması için hibrit NCQDs çözeltilerinin jelleşmesi fizyolojik koşullarda (pH=7,4 ve 37°C) gerçekleştirilmiştir. Dox ve HA oranlarındaki değişikliklerin NCQDs hidrojelının jelleşme süresini nasıl değiştirdiğini değerlendirmek için ters çevirme test yöntemi gerçekleştirilmiştir [293]. Şekil 4.69.’da verilen NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA çözeltilerinin jelleşme sürelerinin bileşene göre değiştiği gözlemlenmiştir. Dox veya HA içermeyen NCQDs çözeltisi 121 saniye sonra jelleştiği ve bununla birlikte hem Dox hem de Dox/HA eklenmesi ile NCQDs çözeltilerinin jelleşme süresinin azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.69. NCQD, NCQD/Dox ve NCQD/Dox/HA kombinasyonlarının jelleşme süreleri ve enjekte edilebilirliği.

NCQDs çözeltileri olan NCQDs-1 (0,4 ağ./hac.), NCQDs-2 (0,6 ağ./hac.) ve NCQDs-3 (0,8 ağ./hac.) içeriğindeki ağırlık/hacim yüzdesindeki artış jelleşme süresinde bir azalmaya neden olmuştur. Benzer şekilde artan Dox [NCQDs/Dox-1 (0,6/0,1 ağ./hac.), NCQDs/Dox-2 (0,6/0,2 ağ./hac.) ve NCQDs/Dox-3 (0,6/0,4 ağ./hac.)] veya HA [NCQDs/Dox/HA-1 (0,6/0,2/0,1 ağ./hac.), NCQDs/Dox/HA-2 (0,6/0,2/0,2 ağ./hac.) ve NCQDs/Dox/HA-3 (0,6/0,2/0,2 ağ./hac.)] konsantrasyonu ile NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA hibritlerinin jelleşme süresinde azalma gözlenmiştir.

Hidrojel içeriğinde yalnızca NCQDs olduğu durumda NCQDs'lerin kendi kendine birleştirilmesinin H-bağlanma etkileşimleri ile gerçekleştiği bilinmektedir [294]. NCQDs'nin yüzeyinde bol miktarda bulunan karboksilik asit ve amin grupları NCQDs-NCQDs ve NCQDs-çözücü arasında H-bağ etkileşimleri oluşturabilir ve NCQDs-çözücü arasındaki etkileşimler NCQDs-NCQDs etkileşimlerine kıyasla zayıf olduğunda jelleşme oluşabilir. Daha fazla stabilizasyon yoğun H-bağları, artan NCQDs konsantrasyonu, jel oluşumu için H-bağlarının önemini destekleyen artan hacim başına reaktif grup sayısı gibi NCQDs-NCQDs arasındaki köprüleri içeren diğer etkileşimlerden kaynaklanabilir. NCQDs numune gruplarında (NCQDs-1, NCQDs-2 ve NCQDs-3), NCQDs/Dox numune gruplarında (NCQDs/Dox-1, NCQDs/Dox-2 ve NCQDs/Dox-3) ve NCQDs/Dox/HA numune gruplarında (NCQDs/Dox/HA-1, NCQDs/Dox/HA-2 ve NCQDs/Dox/HA-3) görülen jelleşme sürelerindeki hafif azalma NCQDs/Dox ile NCQDs numunelerinin arasındaki azalmış olan jelleşme süresine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı değildir.

NCQDs hidrojellerine Dox eklenmesinin jelleşme süresini önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Hibrit hidrojel durumunda NCQDs'nin sadece H-bağı oluşumuna değil aynı zamanda Schiff bazı reaksiyonunun oluşumuna katılmaları jelleşme süresi üzerine etkilidir. Dox'un NCQDs ve Dox arasındaki konjugasyon nedeniyle NCQDs/Dox'un jelleşme süresini azaltmaktan sorumlu olduğu gözlemlenmiştir ve bu da FTIR ve XPS sonuçlarıyla tutarlıdır. Benzer şekilde, Dox konjuge NCQDs hibritinin jelleşme davranışının Dox ve HA yüklü hibritin jelleşme davranışına yakın

olması Dox etkileşiminin ilaç konjuge NCQDs jellerinde baskın olduğunu göstermektedir.

NCQDs/Dox/HA çözeltisindeki HA partiküllerinin NCQDs ve Dox molekülleri ile etkileşime girmeleri Dox konjuge NCQDs'nin daha hızlı bir şekilde bir araya gelmelerine yol açacaktır. NCQDs/Dox/HA'nın jelleşme süresi 80 sn ile 76 sn arasında değişmiştir ve bu süre ileri klinik uygulamalar için faydalı olabilecek bir bileşen ilave edilerek kolayca ayarlanabilir. HA ve NCQDs hidroksil ve karboksil gibi grupları yardımıyla Dox konjuge NCQDs ile hidrojen bağları oluşturabilen hidrofilik malzemelerdir. Şekil 4.69.'da görüldüğü gibi hidrojele HA eklenmesi daha hızlı bir jelleşme ve gözenekliliğin azalmasına neden olmuştur ve bu sonuçlar literatürle uyumludur [295]. Bu tür hızlı jelleşme hidrojel içindeki ilacın daha fazla tutulması ve dolayısıyla daha yavaş bir ilaç salınım modeli sergilenmesini sağlayacaktır. NCQDs yüzeylerindeki karboksil ve amin gruplarının jelleşme süresinde etkili olan H-bağını, Schiff bazı reaksiyonunu [296] ve NCQDs, Dox ve HA arasındaki katyonik-anyonik etkileşimlerini desteklediği düşünülmektedir. Ekstra çapraz bağlanma maddelerinin kullanılmadığı NCQDs hidrojelleri hem fiziksel (H bağları, hidrofilik ve elektrostatik etkileşimler) hem de kimyasal (NCQDs ve Dox arasındaki Schiff bazı reaksiyonu) yerinde çapraz bağlanma ile hazırlanmıştır.

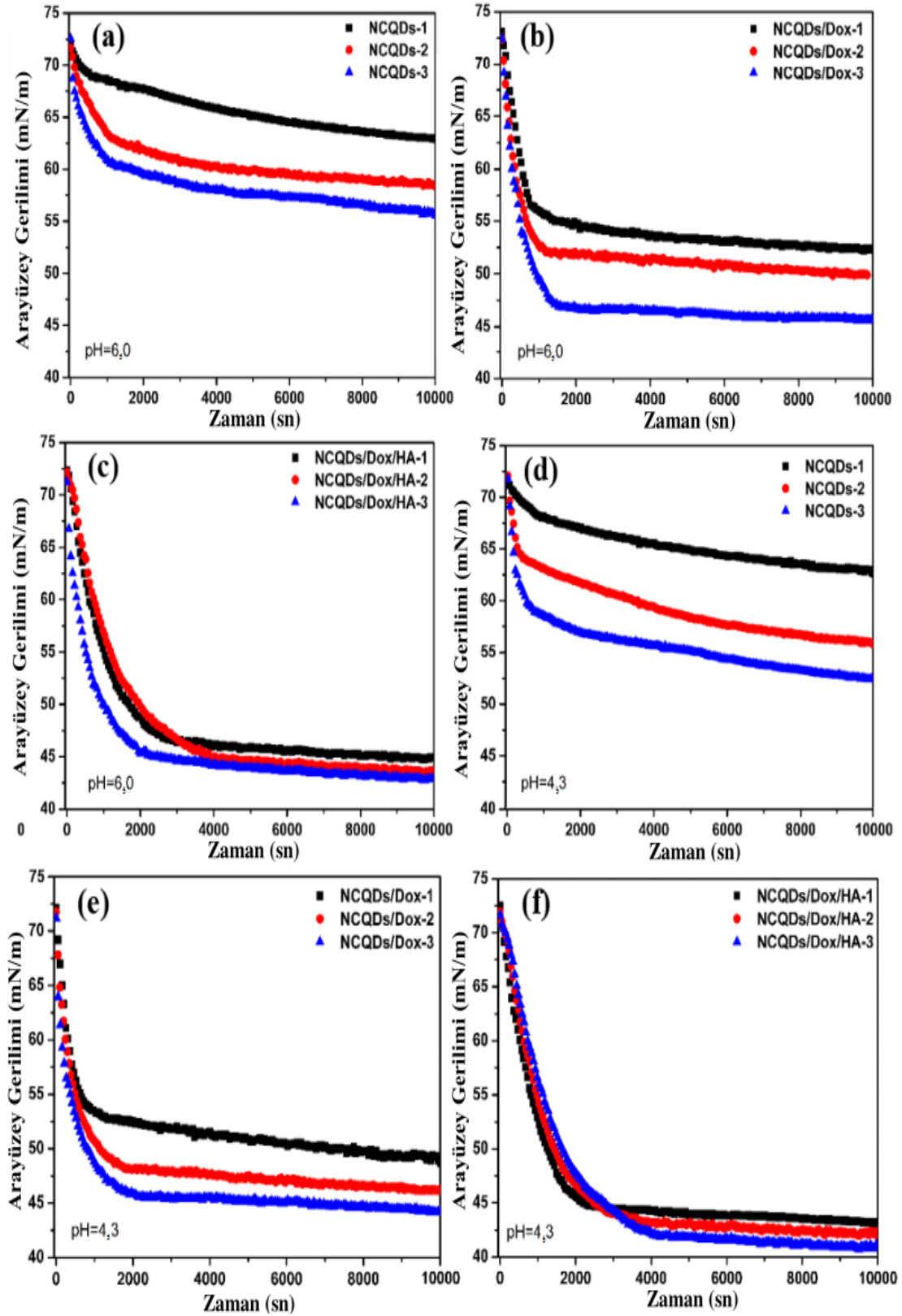
Şekil 4.69. ayrıca NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA kombinasyonlarının enjekte edilebilirliğini göstermektedir. Çözelti enjekte edilebilirliğinin CaP içeriği ile azaldığı bilinmektedir [295] ve NCQDs hibrit hidrojelinin Dox ve HA ilavesi devam ettikçe hafifçe azaldığı gözlemlenmiştir. Dox ve HA eklenmesi NCQDs hidrojellerinin yüksek enjekte edilebilirliğini etkilememiş ve hidrojellerlerin arasında kayda değer bir enjekte edilebilirlik farkına rastlanmamıştır.

Hazırlanan tüm hidrojellerin enjekte edilebilirlikleri %95 ile %90 arasında bulunduğundan dolayı NCQDs/Dox/HA hidrojelinin in-vivo ilaç taşıyıcı olarak klinik uygulamalarda daha az ağrı ve daha küçük yara boyutu ile sonuçlanan minimal invaziv bir prosedür sağlama potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Farklı konsantrasyonlardaki NCQDs çözeltilerinin pH 6,0'da ölçülmüş olan DST eğrileri Şekil 4.70.a'da gösterilmektedir. Adsorpsiyon kinetikleri benzer olduğu gözlemlenmiştir ve farklı arayüzey gerilimi değerleri hava/su arayüzey gerilimlerinin farklı olmalarından kaynaklanmaktadır. Yüzey hidrofilitésine rağmen NCQDs 10000 saniye içinde hızla adsorbe edilmiş ve NCQDs konsantrasyonu arttıkça adsorpsiyon denge süresi neredeyse sabit kalmıştır. Ayrıca artan NCQDs konsantrasyonu ile uzun süreli DST değerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Artan NCQDs konsantrasyonu ile yüzey gerilimindeki azalma, NCQDs'nin grafen oksit çözeltilisindeki adsorpsiyon davranışına [297] ve Dox uygulaması için kullanılan 16Ser/8–8Ser sürfaktanının adsorpsiyon davranışına benzer [298] olarak bulunmuştur.

Dox'un pH 6,0 ve 4,3'teki NCQDs çözeltilisine ait DST değerleri üzerine etkileri sırasıyla Şekil 4.70.b ve e'de gösterilmiştir. NCQDs/Dox karışımının hem pH 6,0 hem de 4,3'ündeki DST eğrilerinin Dox ilave edildikten sonra saf NCQDs çözeltilisine benzer olduğu bulunmuştur. Ayrıca Schiff bazı reaksiyonu NCQDs/Dox kompleksinin oluşumu için uygundur ve Dox'un NCQDs'ye eklenmesi NCQDs arasındaki yük itmesini azaltacaktır. Sonuçlardan görülebileceği gibi Dox düşük konsantrasyonunda DST'de bir azalmaya neden olmuştur ve bu nedenle NCQDs'nin adsorpsiyon davranışı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak NCQDs/Dox kompleksi yüzey adsorpsiyon tabakasına hükmetmektedir ve hem pH 6,0 hem de 4,3'te iki arayüzey arasında gözlenen benzerlik adsorpsiyon olaylarının benzer olduğu anlamına gelmektedir. Mezodenge gerilimine ulaşma zamanı olan adsorpsiyon kinetiğinin Dox ilavesiyle azaldığı gözlemlenmiştir. Dox'un NCQDs tarafından çevrenmesi nedeniyle hibritin difüzyon katsayısının azalmakta olduğu ve sürenin artmasına hacimdeki artışın nedeni olduğu düşünülmektedir. Dengeye ulaşma süresinin artması doğrudan boyuttan etkilenmektedir ve Şekil 4.67.b.'de verilmiş olan hidrodinamik çap sonuçları ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

Şekil 4.70.c ve f'den görüleceği gibi HA eklenmesi NCQD/Dox oluşumunu etkilememiş ve NCQD/Dox'un adsorpsiyon özellikleri neredeyse değişmeden kalmıştır. HA içeriğinin artırılmasıyla yüzey geriliminin azaldığı ve böylece NCQD/Dox/HA'nın adsorpsiyon oranında kademeli bir artış olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.70. (a) ve (d) sırasıyla pH 6,0 ve 4,3'te NCQDs çözeltisi; (b) ve (e) pH 6,0 ve 4,3'te sırasıyla NCQDs/Dox çözeltisi; (c) ve (f) pH 6,0 ve 4,3'te sırasıyla NCQDs/Dox/HA çözeltilerinin zamana bağlı dinamik arayüzey gerilimi ölçümleri.

Bu sonuçların HA'nın Span 80 üzerindeki [299] yüzey gerilimi etkilerinden farklı olduğu görülmüştür. NCQDs/Dox/HA arayüzde diğer çözeltilere kıyasla daha yavaş emilmiştir ve adsorpsiyon kinetiğinin mezodengeye ulaşması için gereken süre HA ilavesi ile 200 saniyeden 400 saniyeye yavaşlamıştır. NCQDs/Dox'un HA etrafına sarılması ile difüzyon katsayısını azaltan hacim artışına neden olduğundan dolayı dengeye ulaşma süresinin arttığı düşünülmektedir. NCQDs ve HA arasındaki etkileşimi ile ilişkilendirilebilen artan dengeye ulaşma süresi doğrudan boyuttan etkilenmektedir [300] ve hidrodinamik çaptaki sonuçlarla tutarlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle NCQDs/Dox veya NCQDs/Dox/HA'dan daha küçük olan NCQDs daha hızlı yayılmakta ve daha önce dengeye ulaşmaktadır. NCQDs HA'nın yüzeyindeki hidrofilik hidroksil varlığından dolayı nanopartikül yüzeylerine adsorbe edilerek hidrojen bağları oluşturabilir. Ayrıca daha yüksek bir HA konsantrasyonunda çarpışma olasılığı artacağı ve böylece NCQDs/Dox/HA hibrit kompleksinin oluşumu destekleneceği için hibrit kompleks oluşumu nanopartiküller arasındaki etkileşim mekanizması olarak düşünülebilir.

Şekil 4.70.d, e ve f'de gösterildiği gibi Dox ve HA'nın NCQDs çözeltisinin DST üzerindeki etkilerinin incelendiği pH 4,3'te ve pH 6,0'da elde edilen sonuçların birbirinden farklı olduğu bulunmuştur. Hazırlanan tüm hibrit çözeltilerin mezodenge arayüzeyi gerilimlerinin pH 4,3'teki karşılık gelen sonuçlara kıyasla azaldığı bulunmuştur. Zıt yüklü olan Dox ve NCQDs molekülleri arasındaki elektrostatik çekim dinamik adsorpsiyon özelliklerini etkilemekte ve NCQDs/Dox hibritinin oluşumunu desteklemektedir. NCQDs/Dox veya NCQDs/Dox/HA hibritlerinin oluşumu NCQDs molekülleri arasındaki elektrostatik adsorpsiyon bariyerini azalmaktadır. Sonuç olarak pH 4,3'te NCQDs/Dox/HA hibrit oluşumu arayüzey yüzeyindeki adsorpsiyon oranını ve yüzey aktivitesini arttırırken DST'yi azalttığı gözlemlenmiştir.

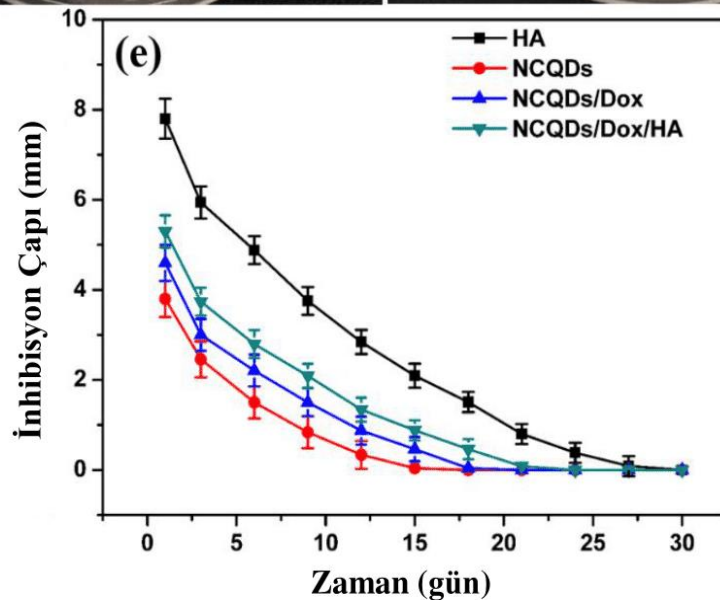
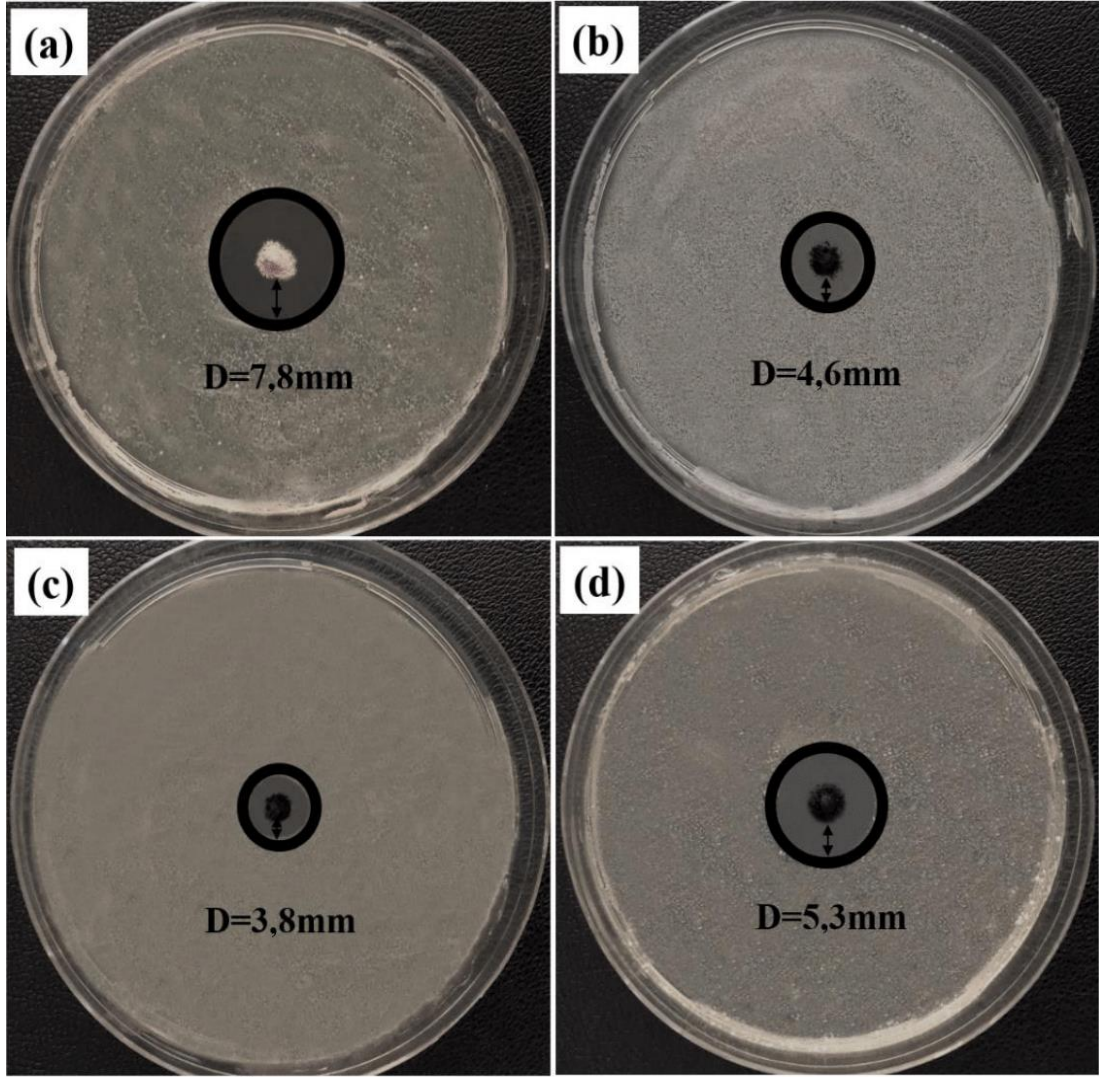
Her bir numunenin arayüzey gerilimindeki başlangıç değerinden itibaren olan azalma hibritlerin ara yüze aşamalı adsorpsiyonuna bağlanabilir. Her iki pH'taki NCQD, Dox ve HA ilaveleri için NCQDs yüzey gerilimi NCQDs/Dox yüzey geriliminden ve NCQDs/Dox yüzey gerilimi NCQDs/Dox/HA yüzey geriliminden daha yüksek olarak

bulunmuştur. Bu durum NCQD, Dox ve HA'nın yüzey gerilimini azaltmada sinerjik bir etkiye sahip olduğunu ve NCQDs'nin Dox ve HA ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Yüzey aktif kompleks olan NCQDs/Dox/HA akıllı ilaç dağıtım sisteminin NCQDs tarafından çevrelenmiş Dox ve HA bileşeninden yapılmış basit ama etkili bir hibrit geliştirmek için, NCQDs-NCQDs arasındaki kovalent olmayan çekimden, NCQDs-Dox arasındaki dinamik kovalent Schiff bazı reaksiyonundan ve NCQDs/Dox-HA arasındaki iyonik çekim merkezlerinden kaynaklanan bir öz-düzenleme mekanizmasından yararlandığı tahmin edilmektedir. NCQDs/Dox/HA nano boyutlu akıllı ilaç taşıyıcı sisteminin biyomembran geçirgenliğini (boyut nedeniyle hücreye geçmek için uygundur ve NCQDs ile çevrili olması hücreye geçişi kolaylaştırır) ve biyoyararlanımı (çapraz bağlayıcı kullanılmamış ve bileşenler biyoyumlu) artırarak toksisiteyi azaltabileceği ve ilaç etkinliğini artırabileceği düşünülmektedir.

İlaç dağıtım sistemlerinde in-vitro antibakteriyel deneyler ameliyat ortamlarından doğabilecek bakteriyel enfeksiyonun önüne geçilmesi açısından öneme sahiptir [301, 302]. Şekil 4.71.'de gösterildiği gibi ilaç dağıtım sistemi olarak araştırılan HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın antibakteriyel aktivitesini araştırmak için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Agar plakaları üzerine aynı miktarda olan toz HA (Şekil 4.71.a), NCQDs (Şekil 4.71.b), NCQDs/Dox (Şekil 4.71.c) ve NCQDs/Dox/HA (Şekil 4.71.d) konulmuştur.

Bu çalışmada cilt enfeksiyonları, sepsis ve kan dolaşımı enfeksiyonları gibi çeşitli hastalıklara neden olabilen ve Gram pozitif patojen olan *S. aureus* seçilmiştir. HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA için inhibisyon bölgeleri agar plakalarında gözlenmiştir ve sırasıyla ortalama 7,8, 4,6, 3,8 ve 5,3mm olarak bulunmuştur. HA'nın diğer numunelere kıyasla en fazla antibakteriyel etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Sentezlenen HA'daki Ca^{2+} varlığı literatürde bildirildiği gibi [303] antibakteriyel aktiviteye neden olabilmektedir. NCQDs *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki göstermiştir ve inhibisyon bölgesinin Şekil 4.71.b'de gösterildiği gibi 4,6mm olduğu bulunmuştur.

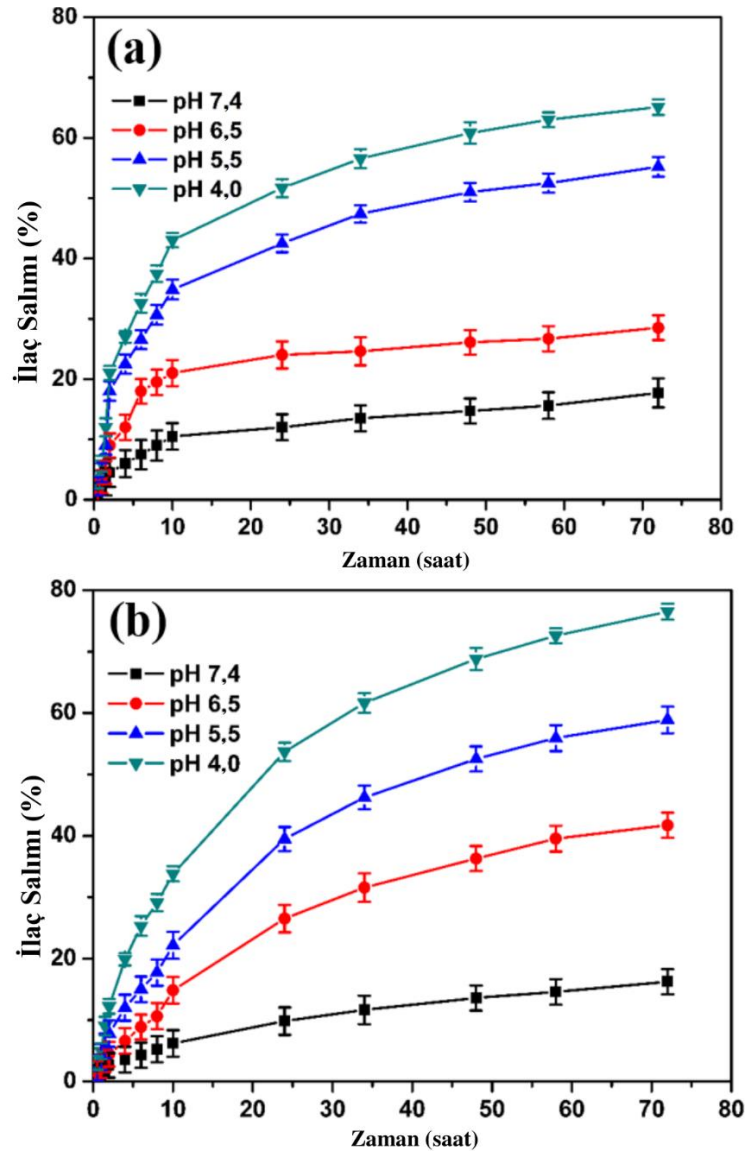


Şekil 4.71. (a) HA, (b) NCQDs, (c) NCQDs/Dox ve (d) NCQDs/Dox/HA'nın agar plakasındaki *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi. (e) HA, NCQDs, NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA'nın zamana karşı inhibisyon bölgesi değerlerindeki değişiklikler.

Saf NCQDs (Şekil 4.71.b) ile karşılaştırıldığında eşit miktarlarda substratın *S. aureus* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğunu gösteren NCQDs/Dox (Şekil 4.71.c) hibritinin inhibisyon bölgesinde bir artış bulunmamıştır ve Dox ilavesi bakteriyel aktiviteyi azaltmıştır. Bu azalma saf NCQDs numuneleri ile karşılaştırıldığında NCQD/Dox numunesindeki NCQDs miktarındaki azalmaya bağlanabilir. Elde edilen NCQDs'nin antibakteriyel özellikleri yakın zamanda yapılan birkaç çalışma [274, 284] ile uyumlu olduğu görülmüştür. HA ilavesiyle inhibisyon bölgesinin 3,8 mm'den 5,3 mm'ye artması kimyasal bağlanma veya fiziksel katılım yoluyla HA'nın hidrojellere eklenmesiyle artmış antimikrobiyal aktiviteye sahip hidrojellerle sonuçlanabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar NCQDs/Dox/HA'nın klinik bakteriyel enfeksiyonu önlemek için iyi bir antibakteriyel ilaç taşıyıcı sistem olarak başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Şekil 4.71.e'den görüleceği gibi *S. aureus*'taki inhibisyon çapının zamana bağlı değişimleri belirlenmiştir ve maksimum inhibisyon çapı değerlerinin 24 saatlik inkübasyonda elde edildiğini ve daha sonra zamana bağlı olarak azaldığı bulunmuştur. *S. aureus* üzerinde uygulanan NCQDs/Dox/HA'nın inhibisyon bölgesi ile ölçülen antibakteriyel aktiviteler HA eklenmemiş numunelerden daha uzun sürerek 23 gün devam etmiştir. Saf NCQDs ve NCQDs/Dox hibrit numuneleri ile karşılaştırıldığında NCQDs/Dox/HA hibritinin en güçlü anti-bakteriyel etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle güçlü ve uzun süreli antimikrobiyal aktiviteye sahip ve düşük maliyetli NCQDs/Dox/HA hibritlerinin klinik uygulamalarda büyük potansiyele sahip olması beklenmektedir.

Akıllı ilaç dağıtımı için NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA hidrojellerinin potansiyel uygulaması, sırasıyla Şekil 4.72.a ve b'de çizilen 37°C'de fizyolojik sıcaklıkta in-vitro ilaç salınımlarının incelenmesiyle değerlendirilmiştir. Farklı pH ortamlarında salınım davranışının değiştiği görülmüştür. İlacın iki hidrojel içinde sürekli salınımı kanser alanında daha fazla ilacın seçici bir şekilde salınma yeteneğinin olup olmadığını öğrenmek için 72 saate kadar pH 7,4, 6,5, 5,5 ve 4,0'teki tampon çözeltilerinde sürekli olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.72. Dox'un (a) NCQDs/Dox ve (b) NCQDs/Dox/HA hidrojellerinden pH 7,4, 6,5, 5,5 ve 4,0'de in-vitro salınımı.

Dox'un erken salınımı normal hücreler için toksik bir etkiye sahip olacağından ilaç salınımının sadece akıllı ilaç dağıtım sistemlerinin başarılı bir şekilde uygulanması için hedef alana ulaşıldığında gerçekleşmesi önemlidir [304]. İlacın vücutta değişen pH değerleri olan farklı hücrelerle etkileşime girebileceğinden dolayı normal dokulardaki toksisiteyi en aza indirmek için ilaç verme sistemlerinin pH'a duyarlı ilaç salınım davranışlarının değerlendirilmesi gereklidir. Bu çalışmada, tümör ve normal dokuların hücre dışı pH'ını (pH=5,7-7,8) taklit etmek için salınım ortamları pH 6,5 ve 7,4'e ayarlanmıştır. Ayrıca tümör içi endozomalın pH'ı 5,5-6,0 olduğundan düşük pH değerlerinde (pH 5,5'te) pH'a bağlı salınım davranışı incelenmiştir. Her iki hidrojele

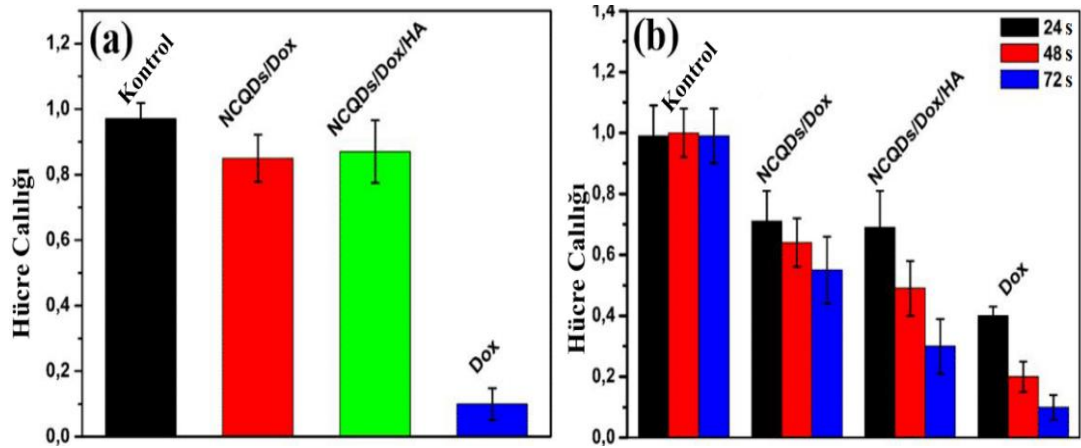
ait kümülatif ilaç salınım davranışı yavaş olup ilki hızlı ve kısa süreli olan ikincisi ise tüm pH'larda nispeten daha yavaş ve uzun süreli olan iki aşamalı salınım profili sergilediği görülmüştür. NCQDs/Dox'taki Dox'un salınım oranı NCQDs/Dox/HA'daki Dox'tan daha hızlıdır ve her iki hidrojel için ortamın pH'ından daha fazla etkilendiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar NCQDs/Dox/HA'daki Dox'un hidrojellere iyi bir şekilde dâhil edildiğini ve NCQDs/Dox/HA hidrojelindeki Dox bağlantılarının NCQDs/Dox hidrojeline kıyasla arttığını doğrulamaktadır. Fizyolojik pH'da kararlı ve asidik pH'ta kararsız olan Dox ve NCQDs arasındaki dinamik geri dönüşümlü Schiff bazı nedeniyle ortam pH'ını 7,4'ten 6,5, 5,5 ve 4,0'a düşürerek her iki hidrojeldeki in-vitro ilaç salınımının hızlandırılabilirdiği görülmüştür. Ayrıca NCQDs, Dox ve HA arasındaki hidrojen bağlanma etkileşimi pH 7'de en güçlüdür ve hidrojen bağlanma etkileşimleri asit koşullarında zayıfladığından dolayı etkili olmayan bir ilaç salınımı ile sonuçlanmıştır. pH 6,5 aside duyarlı bir bağ için düşük oranda kırılacağı zayıf asit ortamıdır ve ortamda çok fazla su uzaklaştırılmadığı sürece bu bağ dinamik geri dönüşümlü bir reaksiyondur. pH 5,5 ve özellikle 4,0'da bağın daha hızlı kırılma oranı nedeniyle hidrojellerin yüksek oranda aside duyarlı Dox salınımına sahip olduğunu gösteren yüksek bir salınım profili gözlemlenmiştir.

Şekil 4.72.a ve b'de gösterildiği gibi pH'ın 7,4'ten 4,0'a düşürülmesi ile Dox salınımı NCQDs/Dox için %17'den %65'e yükselir iken NCQDs/Dox/HA için %16'dan %74'e yükseldiği gözlenmiştir. Schiff bazının pH'a duyarlılığına ek olarak HA ve Dox arasındaki etkileşimi zayıflattığı düşünülen HA'nın çözünmesi [305] ilacın asidik koşullarda salınmasına yardımcı olmaktadır. Dox'un NCQDs/Dox hidrojelinde ilk anlardaki ilaç patlaması olarak adlandırılan hızlı salınımı kısmen gözlenmiş iken NCQDs/Dox/HA hidrojelinde ise ilaç patlaması olmadan salınımının devam ettiği görülmüştür. pH 7,4'te 72 saat sonunda NCQDs/Dox/HA hidrojelinden Dox salınımının yüzdesi sadece %15 olarak bulunmuştur ve bunun tümör dokusuna ulaşan ilaç miktarını artıracığı düşünülmektedir. Mevcut hidrojel sisteminde asidik pH'ta protonlanmış ve pozitif yüklü amin gruplarından dolayı NCQDs bazlı hidrojellere yüklenen ilaçlar hidrojellerdeki dinamik Schiff bazlı bağlar ve iyonik etkileşimler zayıflatılarak veya parçalanarak serbest bırakılabilir.

pH'a duyarlı akıllı hidrojellerden normal dokuya kıyasla kanserli dokular etrafında daha fazla Dox salınımı normal doku için yan etkileri azaltırken aynı zamanda tümör hücrelerini öldürmek için ilaç verimliliğini artırır [306]. HA bazlı Dox dağıtım sistemlerinin ayrıca asidik koşullarda DOX'un gelişmiş salınımını gösterdiği önceki sonuçlarla [285] kıyaslandığında yapılan bu çalışmada 72 saat sonra ilaç salınımının daha düşük olması NCQDs ve Dox arasındaki etkileşimle kendi kendine çapraz bağlanmış olan hidrojel ağından kaynaklandığı düşünülmektedir. pH'a bağımlı aktif ilaç salınımından dolayı akıllı hedefli ilaç taşıma uygulamaları için NCQDs/Dox/HA hibritinin kullanılabilir olduğu anlaşılmaktadır.

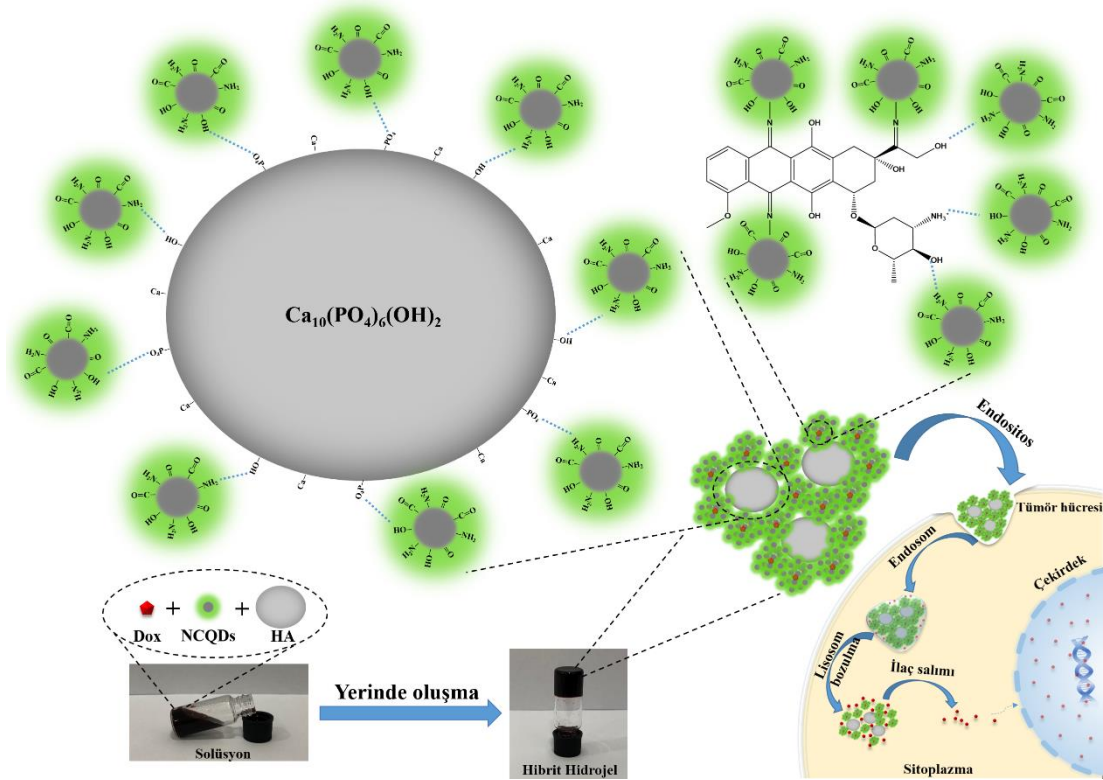
Düşük absorbansın daha yüksek hücre inhibisyon hızı anlamına geldiği MTT analizi, hazırlanan numunelerin hücre inhibisyon oranını göstermektedir. Şekil 4.73.a'da meme kanseri hücre hattı MCF-7 kullanılarak 24 saat boyunca pH 7,4'te gerçekleştirilen MTT testinde NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA hidrojelleri ile kontrol olarak kullanılan doku kültürü plakaları (TCP'ler) benzer canlılık göstermiştir. Şekil 4.72.b'de gösterildiği gibi pH 7,4'te 24 saat sonra NCQDs/Dox/HA hidrojelinde salınan Dox, sadece %14 olduğu için hücre öldürebilirliği oldukça düşüktür. Tümör dokularını taklit etmek için pH 6,5'deki zayıf asidik hücre kültürü ortamında elde edilen farklı kültür periyotlarındaki hidrojellerin sitotoksiteleri Şekil 4.73.b'de verilmiştir. Şekil 4.72.'de görüldüğü gibi 6,5 pH'ta NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA hidrojelinde 24 saat sonunda salınan Dox miktarları sırasıyla %24 ve %27 olarak bulunmuştur. Şekil 4.73.b'de gösterildiği gibi NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA ile kültürlenmiş hücrelerin %25'i kontrole kıyasla önemli ölçüde inhibe edilmiş ve hücre canlılığı 24 saat sonra anlamlı bir fark göstermemiştir. Şekil 4.72.'de gösterildiği gibi 6,5 pH'ta 48 saat sonra NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA hidrojelinde sırasıyla %26 ve %37 oranında Dox'un serbest bırakıldığı gözlenmiştir. Hücre canlılığı NCQDs/Dox için %63 iken NCQDs/Dox/HA için %48'e düştüğü görülmüştür. 72 saat sonra benzer bir durum gözlenmiştir ve iki hidrojelin hücre inhibisyon oranları arasındaki farkın arttığı gözlemlenmiştir. 72 saat sonra her iki hidrojel grubunun hücre sayısının etkili bir şekilde azaldığı ve NCQD/Dox/HA hidrojel grubu için hücre canlılığı %69'dan %29'a düştüğü gözlenmiştir.

Şekil 4.73.b’de gösterildiği gibi, 1. günden 3. güne kadar MCF-7 ile kültürlenmiş NCQDs/Dox/HA hidrojel grupları, saf Dox’tan sonra en yüksek hücre inhibisyonunu göstermiştir. Literatürdeki bir çalışmada [307] Dox konsantrasyonundaki artışın kanser hücrelerindeki canlılığı azalttığından bahsedilmektedir. Elde edilen NCQD/Dox/HA’nın kanser hücrelerindeki etkinliğinin önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir ve bu amaçla kullanılan benzer bir kompozite literatürde rastlanmamıştır. NCQDs/Dox ve NCQDs/Dox/HA hidrojellerinin hücre canlılığı farklarındaki artış mevcut çalışmadaki önceki sonuçlarla uyumludur ve daha önce belirtildiği gibi Dox salınımının asidik ortamda arttığını göstermektedir.



Şekil 4.73. MCF-7 hücrelerinin (a) 24 saat boyunca pH 7,4 ve (b) 24 saat (siyah), 48 saat (kırmızı) ve 72 saat (mavi) için pH 6,5’deki canlılıkları.

Şekil 4.72.’deki veriler göz önüne alındığında, geliştirilen NCQD/Dox/HA hidrojelleri tümör benzeri bir ortamda hücre inhibisyonu için mükemmel bir kapasite sergilerken nötr fizyolojik ortamdaki hücrelere karşı neredeyse toksik olmadığı ve pH’a karşı oldukça hassas olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma kapsamında tasarlanan akıllı ilaç taşıyıcı sistemin bileşenler arasındaki bağları, yerinde sol-jel geçişini ve hücre içi ilaç dağılımını açıklayan şematik gösterimi Şekil 4.74.’te verilmiştir.



Şekil 4.74. Olası kendi kendine çapraz bağlanan kimyasal etkileşimler ile yerinde oluşturulan çok fonksiyonlu NCQDs/Dox/HA hibrit hidrojel ve tümör hücresi tarafından tetiklenen salınım mekanizması için şematik gösterim.

Literatürde pH'a duyarlı Dox taşınan akıllı ilaç dağıtım sistemlerinin nötr ve asidik pH'da ilaç salınım yüzdeleri ile normal ve kanser hücre canlılığının karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Antibakteriyellik, nötr ve asidik pH'ta ilaç salınım yüzdesi ve ayrıca hücre canlılığı yüzdesi için farklı ilaç iletim sistemlerini içeren bildirilmiş bir çalışma daha önce bildiğimiz kadarıyla bulunmamaktadır. Bu nedenle literatürdeki antibakteriyellik, enjekte edilebilirlik, nötr ve asidik pH'ta ilaç salınım yüzdesi ve ayrıca hücre canlılığı yüzdesi için farklı ilaç iletim sistemlerini içeren bazı çalışmalar karşılaştırılmıştır. Tablo 4.12.'de, NCQDs'nin normal hücre üzerindeki hücre yaşayabilirliğinin önceki çalışmalara benzer olduğu fakat kanser hücresindeki hücre canlılıklarının farklı olduğu görülmektedir. Elde edilen sistem aynı zamanda antibakteriyel ve enjekte edilebilirdir ve asidik ortamda ilaç salınımı diğer çalışmalara göre yüksekken nötr pH'da ilaç salınımının düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, kanser tedavisi için pH'a duyarlı enjekte edilebilir yerinde oluşturulabilen (in-situ) harici olarak aktifleştirilmiş Dox salınımı ile yenilikçi tasarıma sahip NCQDs/HA/Dox çok fonksiyonlu akıllı hidrojel geliştirmesi amaçlanmıştır. NCQDs

çok bileşenli hidrojel kolayca üretmek için Şekil 4.74.'te gösterildiği gibi HA ve Dox arasındaki Schiff bazı, hidrojen bağı ve iyonik olarak birçok etkileşim sağlanmıştır. Zararlı salınımına sebep olabilecek çapraz bağlanma kimyasallarının kullanılmadığı kendi kendine çapraz bağlanma yoluyla oluşan kararlı hidrojel oluşturmak için fizyolojik koşullar altında oluşan dinamik kimyasal ve fiziksel etkileşimler kullanılmıştır.

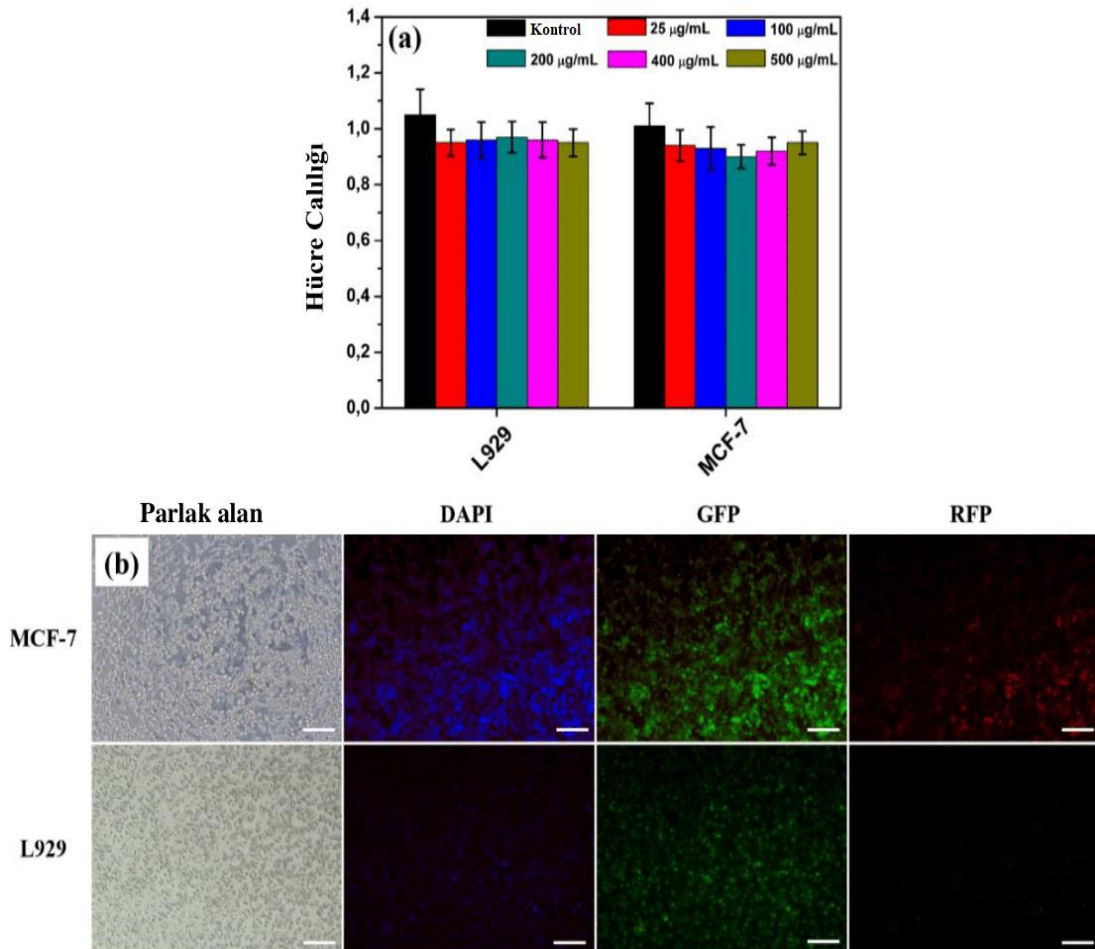
Sentezlenmiş NCQDs'nin biyomedikal görüntüleme uygulaması hem kanser hücresi modeli olarak meme kanseri hücresinde (MCF-7) hem de normal hücre modeli olarak fare fibroblast hücresinde (L929) değerlendirilmiştir. L929 ve MCF-7 hücrelerinin canlılığı 0–500 $\mu\text{g/mL}$ NCQDs (25, 100, 200, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$) ile karıştırıldıktan sonra MTT analizi kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.76.a'da hesaplanan sonuçlardan görülebileceği gibi, L929 veya MCF-7 hücrelerinin NCQDs ile 24 saat boyunca 500 $\mu\text{g/mL}$ gibi yüksek NCQDs konsantrasyonunda bile inkübe edilmesiyle %100'e yakın canlılık gözlenmiştir. Hela hücresi kullanılarak hücre canlılığının araştırıldığı bir çalışmada [309] benzer yanıt gözlenmiştir ancak akıllı bir ilaç verme sistemi olarak çalışılmamıştır. Mevcut çalışmada elde edilen bu sonuçlar NCQDs'nin düşük sitotoksosite ve iyi biyouyumluluğa sahip olduğunu doğrulamakta ayrıca NCQDs'nin ilaç dağıtımı ve biyogörüntüleme gibi biyolojik uygulamalarda da kullanılabileceği anlamına gelmektedir.

NCQDs'nin çok renkli biyogörüntüleme potansiyelleri NCQDs'nin (1 $\mu\text{g/mL}$) L929 ve MCF-7 hücreleriyle 37°C'de 1 saat inkübasyonunun ardından konfokal floresan mikroskop kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 4.76.b'den görüleceği gibi MCF-7 hücreleri yüksek yeşil, yüksek mavi ve az kırmızı floresans göstermiştir. Muhtemelen kanser hücrelerinde yüksek hücresel alım ve metabolizma nedeniyle [310] boyanma farklılıklarının MCF-7 hücrelerinde oldukça görünür olduğu gözlenmiştir. Kırmızı flüoresansın tamamen solduğu ve L929'da diğer kanser hücre dizilerine kıyasla daha az flüoresan görüntüleme potansiyeli gözlemlenmiştir.

Tablo 4.12. Güncel literatürde bazı pH'a duyarlı ve Dox taşınan akıllı ilaç dağıtım sistemlerinin karşılaştırılması ve özeti.

Bileşen	İlaç	Antibakteriyel	Enjekte Edilebilir	İlaç Salınımı, %		Hücre Canlılığı, %		Referans
				Nötr pH'ta	Asidik pH'ta	Normal Hücreler	Kanser Hücreleri	
Dox/HA/FA	Dox	Hayır	Hayır	~20	~82	~90-100	~45-50	[308]
Zn-HA/Dox	Dox	Hayır	Hayır	~14	~66	~90-100	-	[273]
FA/CH/GOQD/Dox	Dox	Hayır	Hayır	~10	~60	~25-90	~40-70	[304]
Dox/SrHA	Dox	Hayır	Hayır	~20	~23	-	~50-60	[306]
NHA-Gd/Dox	Dox	Hayır	Hayır	~25	~65	~80-90	~25-40	[285]
Dox/Glut/Gly/HA	Dox	Hayır	Hayır	~8	~48	~90-100	-	[287]
mPEG/PCL/Imi/Dox	Dox	Hayır	Hayır	~20	~60	~90-100	~50-60	[286]
NCQDs/Dox/HA	Dox	Evet	Evet	~10	~80	~90-100	~30-40	Mevcut çalışma

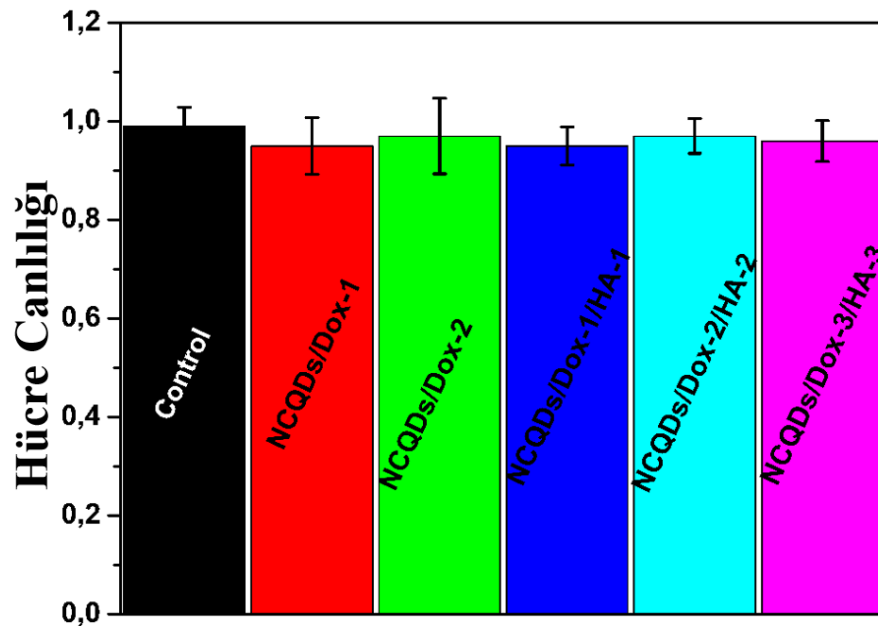
Ayrıca, L929 hücreleri mavi filtre üzerinde daha az floresan görüntü vermiş fakat yine de makul görünürlük sergiledikleri gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar literatürdeki çalışma [311] ile uyumludur, ancak L929 ve MCF-7 hakkında henüz bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Mevcut çalışmada sentezlenen NCQDs'nin L929 ve MCF-7 üzerinde mavi, yeşil ve kırmızı filtrelerde flüoresan özellikler sergilemeleri nedeniyle in-vivo görüntüleme için ümit vaat ettikleri düşünülmektedir.



Şekil 4.75. (a) 24 saatlik inkübasyondan sonra NCQDs'nin konsantrasyonunun L929 ve MCF-7 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi (n = 3). (b) L929 ve MCF-7 hücre hatlarında 1 saat boyunca kültürlenen NCQDs'nin (1 µg/mL) DAPI (Mavi), GFP (Yeşil) ve RFP (Kırmızı) görüntüleri. Ölçek çubuğu = 200 µm.

Şekil 4.77.'de gösterildiği gibi, HA veya Dox konsantrasyonlarının değiştirilmesinin NCQDs bazlı hidrojellerin hücre canlılığını neredeyse etkilenmediği ve hidrojel gruplarının hücre canlılığında önemli bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Dox ve HA içeriği değişen NCQDs/Dox/HA hidrojel grupları %95'in üzerinde hücre canlılığı

sergilendiği gözlemlenmiştir. Yakın zamanda bildirilen enjekte edilebilir HA bazlı kompozit çalışmasında [312] HA'nın belirli bir yaşayabilirliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada da uyumlu olarak yüksek HA konsantrasyonunda yüksek hücre canlılığına sahip enjekte edilebilir bir hibrit elde edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar belirli miktarlarda eklenen HA veya Dox'un hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkisi olmadığını ve hidrojelilerin akıllı dağıtım sistemi olarak kullanımının uygunluğunu göstermiştir.



Şekil 4.76. MTT ile ölçülen inkübasyondan sonra hücre canlılığı. $n = 3 \pm SD$.

BÖLÜM 5. GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak HA'nın mikrodalga destekli biyomimetik sentezi çalışmasında farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak biyomimetik sentezlenmiş HA'nın özellikleri araştırılmıştır. Biyomimetik HA sentezi 15 dakika boyunca 800W gücünde farklı kalsiyum kaynaklarına sahip 1,5xSBF çözeltisi kullanılarak mikrodalga fırınında gerçekleştirilmiştir. Fosfat kaynağı olan di-amonyum hidrojen fosfat ((NH₄)₂HPO₄), kalsiyum kaynakları olan ise kalsiyum klorür (CaCl₂), kalsiyum nitrat tetrahidrat (Ca(NO₃)₂.4H₂O) ve kalsiyum hidroksit (Ca(OH)₂) her bir numune için sırasıyla kullanılmıştır. Karşılaştırma için ayrıca biyomimetik HA eldesi kalsiyum ve fosfat kaynakları kullanılmadan sadece 1,5xSBF çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen HA tozlarındaki fazların varlığı XRD ile analiz edilmiştir. Kristalinite ve kristal boyutları XRD verileri kullanılarak hesaplanmıştır. Kalsiyum nitrat tetrahidrat ve kalsiyum hidroksit kaynakları kullanılarak elde edilen toz tek fazlı HA iken; CaCl₂ kaynağı için baskın faz TCP ve ilave Ca kaynağı içermeyen 1,5xSBF için baskın faz HA olarak elde edilmiştir. Bu işlem kullanılarak hegzagonal çubuklar ve nano-küresel HA sentezlenebileceğini SEM analizleri ile ortaya koyulmuştur. EDS analizi ile Ca/P oranı kemikte bulunan Ca/P değeri olan 1,5 'e yakın olduğu bulunmuştur. Yapılan XRD, Raman ve FTIR analizleri birbirleri ile tutarlı olarak tek fazın varlığının HA olduğunu gösterilmiştir. Sentezlenen HA tozlarının kristal boyutu ve kristalinitesi sırasıyla 29,5 ve 45,4 nm ve 0,53–2,37 arasında değişmektedir. Elde edilen sonuçlar, mikrodalga destekli biyomimetik sentezin daha kısa işlem süresinde HA tozları elde etmek için ümit verici bir yöntem olduğunu göstermiştir. Biyomimetik yöntem kullanılarak üç farklı Ca kaynağı ile 1,5xSBF'de mikrodalga destekli biyomimetik yöntem kullanılarak sentezlenmesi, karakterize edilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmış ayrıca daha ileri araştırmalar için sonuçlar yorumlanarak bazı önerilerde bulunulmuştur.

Grafen oksidin indirgenmesinin HA ve TCP oluşumuna olan etkisi çalışmasında bifazik HA/TCP biyomineralizasyonu için farklı oranlarda indirgenmiş RGO'nun altlık olarak biyomimetik ortamda kullanımı rapor edilmiştir. RGO-HA/TCP hibrit kompozitler SBF biyomineralizasyonu yoluyla sentezlenmiştir. 3 hafta boyunca 37°C ve 7,4 pH'da biyomineralizasyonun gerçekleştirilmesi için GO nanopartikülleri 5xSBF içinde bekletilmeden önce sodyum borhidrür (NaBH₄) ile indirgenmiştir. Tüm GO yüzeyleri negatif yüklüdür ve nötr pH'ta GO, R1GO, R2GO, R3GO'nun zeta potansiyelleri sırasıyla -35,05, -30,01, -29,5, -29,01 ve -28,9; temas açıları sırasıyla 33,5, 55,3, 57,4 ve 61,1 olarak bulunmuştur. Raman analizi ile belirlenen I_D/I_G değerleri GO, R1GO, R2GO ve R3GO için sırasıyla 1,01, 1,02, 1,04 ve 1,07'dir. R1GO ve R2GO üzerindeki bifazik HA/TCP çökmesi XRD, FTIR ve TGA analizi ile doğrulanmıştır. GO'da oksijen içeren hidrofilik fonksiyonel grupların biyomineralizasyon süreci üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla sentezlenen GO farklı oranlarda indirgenmiştir ve biyomimetik yöntemle RGO numuneleri üzerinde biyomineralizasyon gerçekleştirilmiştir.

Ti üzerinde biyomimetik yöntemle HA oluşumunda ön yüzey işlemlerin karşılaştırılması çalışmasında Ti substratındaki HA kaplama biyomimetik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. pH 7,4 ve 37°C'de 1,5xSBF içinde bekletilen Ti plakalar bir, iki ve dört hafta sonunda analiz edilmiştir. SBF'de bekletilme işlemi ilk hafta sonunda optimum olarak seçilen ön yüzey işlemi uygulanmış numune ile sürdürülmüştür. Optimum yüzey işleminin belirlenmesi için üç farklı işlem uygulanmıştır. Bunun için her bir substrat 600°C'de 1 saat süreyle ısıtılma işleminden önce ayrı ayrı hazırlanan NaOH, HCl ve NaOH+HCl çözeltilerine daldırılmıştır ve NaOH çözeltisi ile yapılan ön yüzey işleminin optimum yüzey işlemi olduğu belirlenmiştir. Ti yüzeylerinde bifazik HA ve TCP varlığı XRD ile doğrulanmıştır. SEM çalışmaları ilk hafta sonunda NaOH ön yüzey işlemine tabi tutulmuş Ti yüzeyinde nano-küresel morfolojide oluşan HA kaplamanın diğer ön yüzey işlemi uygulananlara göre (HCl ve NaOH+HCl) daha yoğun olduğunu ve kaplamanın kalınlığının daldırma süresinin uzamasıyla arttığını göstermiştir. HA kaplama kalınlığının ikinci ve dördüncü hafta sonunda sırasıyla 178 µm ve 340 µm olarak bulunmuştur. Sinterleme öncesi ve sonrası substrat üzerindeki kaplama tabakasından sıyrılan bifazik HA tozlarının parçacık

boyutu analizi sonucu 0,58 μm ortalama partikül büyüklüğüne sahip olduğunu ve parçacık boyutu dağılımının sinterlemeden sonra azaldığı gözlemlenmiştir. EDS analizi ile HA tozlarının Ca/P oranının 1,5'e yakın olduğu karakterize edilmiştir. Raman ve FTIR sonuçları XRD ile uyumlu bir şekilde biyomimetik kaplama işleminden sonra bifazik HA varlığını ve sinterleme sonrası tozların kristallik derecesinde artış olduğunu göstermiştir. NaOH ön yüzey işlemleri Ti numunelerindeki HA çekirdeklenmesinin diğer ön yüzey işlemlerden geçirilmiş Ti numunelerinden daha fazla olduğu EIS ile de doğrulanmıştır. 1 saat süreyle 600°C'de ısıl işlemden önce kaplama kalitesini iyileştirmek için Ti yüzey üzerinde üç tip ön yüzey işlem kullanılmıştır: alkali, asit ve alkali+asit. Bu işlemlerin Ti üzerinde CaP oluşumunu arttırmaya yönelik etkileri incelenmiştir.

Kemik doku mühendisliği için 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA kompozit iskeleler çalışmasında dondurulmaları (-40°C ve $0,9^{\circ}\text{C}/\text{dk}$) sonrasında liyofilizasyonla (48 saat, 0°C ve 200 mtorr) üretilen yeni Col/fMWCNT/CS/HA kompozit iskeleleri üretilmiştir. 3B gözenekli Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS iskelelerinin karşılaştırılması için basma (523'ten 1112 kPa'ya kadar), şişme (%513,9 \pm 27'den %481,05 \pm 25'e kadar), gözeneklilik (%98 \pm 0,15'ten %95,7 \pm 0,1'e kadar), temas açısı (87,8°'den 76,7°'ye kadar) ölçümleri biyomineralizasyon öncesi ve sonrası incelenmiştir. Biyomineralizasyon konsantre SBF'de (10xSBF, 37°C ve 6,5 pH) biyomimetik yöntemle gerçekleştirilmiştir. XRD, SEM, EDS, FTIR, TGA, Optik mikroskop ve BET sonuçları Col, CS ve Col/fMWCNT iskelelerine kıyasla, Col/fMWCNT/CS iskelelerinin daha yüksek in-vitro biyoaktiviteye, geniş yüzey alanına (11,746 m^2/g), iyi bir gözenek hacmine (0,026 cc/g) ve birbirine bağlı gözenekli mikro yapıya (20-350 μm gözenek boyutu ile) sahip olduğunu göstermiştir. Son olarak Col, fMWCNT, CS ve HA'nın avantajlı özelliklerini içeren Col/fMWCNT/CS iskelelerinin iyi biyoyumluluğa sahip olduğunu gösteren sitotoksitesisi MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Yeni bir yüksek gözenekli (>%95) 3B Col/fMWCNT/CS/HA kemik yapı iskelesini oluşturan bileşenler her birinin ayrı özelliklerinden [112] ve birbirleriyle bağlanmalarından dolayı seçilmiştir. Ayrıca üretilen yapı iskelesinin biyomimetik yöntemle kemik benzeri HA biyomineralizasyonunu artırılması amaçlanmıştır. SBF kullanılarak gerçekleştirilen

bu yöntem yüksek işlem sıcaklığı veya özel ekipman gerektirmeden malzeme üzerinde kemik benzeri HA'yı homojen dağılım zorluğu olmadan kendiliğinden bir araya getirebilir. Elde edilen yapı iskelesinin mekanik ve biyomineralizasyon özellikleri kayda değer bir şekilde iyileştirilmiştir. Hazırlanan biyomimetik nanokompozit olan 3B Col/fMWCNT/CS/HA gözenekli yapı iskelesinin kemik doku mühendisliği alanında kullanılmak için uygun olduğu bulunmuştur.

Yeni m-5xSBF'de monofazik brushitin Ti6Al4V üzerinde biyomimetik yöntemle kaplaması çalışmasında 37°C ve pH 6'da m-5xSBF ve 5xSBF çözeltilerinde biyomimetik CaP kaplama öncesi plakalar Na_{0,23}TiO₂ faz oluşumu ile sonuçlanan alkali işleme maruz bırakılmıştır. Bu çalışmanın amacı yeni bir biyomimetik ortamda Ti6Al4V substratı üzerindeki CaP çekirdeklenmesini incelemek ve 2 günde homojen morfolojide olan tek fazlı CaPs kaplamasını elde etmektir. Başarılı bir şekilde kaplanmış yüzeylerin karakterizasyonu SEM, EDS, FESEM, FTIR, Raman ve temas açısı ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Yüzeydeki kaplanmış CaP tozlarının faz oluşumu (Na_{0,23}TiO₂, 22-1404; TiO₂, 21-1276; CaHPO₄(H₂O)₂, 72-0713 ve Ca₅(PO₄)₃OH, 09-0432), ortalama parçacık büyüklüğü dağılımı (HA için 0,1-1,8 µm ve brushit için genişlik ve uzunluk sırasıyla 0,5-4,7µm ile 10,7-239,4 µm), faz dönüşümleri (brushitten kalsiyum pirofosfata) sırasıyla XRD, DLS tekniği, BET ve TGA ile incelenmiştir. Sonuç olarak, m-5xSBF biyomimetik ortamda Ti6Al4V üzerine ilk kez monofazik brushit fazının kaplanması mümkün olmuştur ve monofazik brushit kaplamalı yüzey karakterizasyonu 5xSBF'de elde edilen HA kaplı yüzey ile karşılaştırılmıştır.

Çözelti ve kalsinasyon süresinin sol-jel HA sentezi üzerine etkisi çalışmasında nano boyutlu HA farklı kalsinasyon sürelerinde (1s, 2s ve 4 s) H₃PO₄ ve Ca(OH)₂ başlangıç maddeleri kullanılarak pH 11'deki su ve etanol bazlı çözeltilerde sol-jel metodu ile sentezlenmiştir. Kalsinasyon süresinin ve çözeltinin HA nanopartiküllerinin kristallliği, morfolojisi ve safsızlık fazları üzerindeki etkileri FTIR, SEM, EDS ve XRD karakterizasyonları ile incelenmiştir. Sentezlenen numunelerin kristal boyutunun ve kristalinite kesrinin kalsinasyon süresi ile arttığı bulunmuştur. Çözelti ortamına göre su bazlı çözücüde yalnızca safsızlık olarak CaO oluşumu gözlemlenmişken etanol

bazlı çözücüde CaO ve Ca(OH)₂ safsızlıkları karakterize edilmiştir. Parametrelere bağlı olarak en düşük kristallik 0,92 ve en yüksek kristallik 1,73 olarak bulunmuştur. Sentezlenen toz numunelerdeki Ca/P oranının kemiğin oranına en yakın olarak 1,518 olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak kalsiyum hidroksit ve fosforik asit kullanılarak sentezlenen nano boyutlu HA için 1 saatlik kalsinasyon süresinin kullanıldığı su bazlı sol-jel işlemi optimum olarak tanımlanmıştır. HA üretmek için birçok yöntem kullanılmasına rağmen sol-jel işlemi ile ilgili çeşitli parametrelerin nano boyutlu tozun şekli, kristalliği ve büyüklüğü üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar kısıtlıdır [313]. Bu çalışmada sol-jel yöntemiyle sentezlenen HA tozunun özellikleri karıştırma süresi, ortam pH'ı, yaşlanma süresi, Ca/P oranı veya sıcaklık gibi işlem parametrelerinin değiştirilmesiyle araştırılmıştır. Kalsiyum hidroksit ve fosforik asitin kalsiyum ve fosfat kaynağı olarak kullanıldığı sol-jel yöntemi ile ilgili olan literatür çalışmalarında kalsinasyon süresi parametresi ile aynı zamanda ve etanol ile suyun kullanıldığı çözelti parametresinin yer aldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu parametrelerin değiştirilmesi ile elde edilen HA numunelerinin yapısal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Ag, Zn veya Co katkılı HA'nın biyomimetik sentezi ve fonksiyonel Ti üzerinde Ag, Zn veya Co katkılı HA/fMWCNT kompozitinin kaplanması çalışmasında biyomimetik işlem kullanılarak başarıyla sentezlenmiş olan yeni kompozit silan fonksiyonellendirilmiş Ti yüzeyine kovalent immobilizasyon yoluyla kimyasal olarak kaplanmıştır. Uygulanan yüzeysel işlevsellik ve biriktirme yaklaşımda NaOH ve APTES ile ön işleme tabi tutulmuş Ti özellikleri kompozit kaplama öncesi incelenmiştir. MWCNT yüzeyinde asidik işlemle oksijenli fonksiyonel gruplar oluşturulmuştur. Sentezlenen tozlar SEM, XRD, EDS, TGA, FTIR, Raman kullanılarak karakterize edilmiştir. Substratların yüzey enerjileri kaplama ile birlikte 46,03 mN/m (Ti)'den 43,79 mN/m'ye (Ti/fMWCNT/Ag, Zn veya Co katkılı HA) düşürülmüştür. APTES, fMWCNT ve katkılanmamış veya katkılı HA içeren Ti yüzeylerinin temas açıları 40,03±1,2°'den 49,05±1,6°'ye artmıştır. Sonuçlar hazırlanan SBF ortamına ilave edilen Ag⁺, Zn²⁺ veya Co²⁺'nın HA kafes yapısına sırasıyla %1,06, %1,86 ve %1,78 oranında yerleştirildiğini göstermiştir. Sentezlenen kompozitlerin biyoyumluluğu in-vitro MTT analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir ve hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etki gözlemlenmemiştir. Bu

çalışma f MWCNT/Ag, Zn veya Co katkılı HA kaplamasının biyomalzeme kaplama alanlarındaki potansiyel uygulamalar için gelecek vaat ettiğini göstermektedir. Çalışmanın amacı biyomimetik yöntemle katkılı HA sentezini araştırmak ve fonksiyonellendirilmiş Ti substrat üzerinde katkılı HA ve f MWCNT kompozit kaplamasını gerçekleştirmektir. Bu çalışmada, Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} iyon katkıları için gümüş nitrat, çinko nitrat veya kobalt nitrat başlangıç maddelerini içeren SBF kullanılmıştır. Ag^+ , Zn^{2+} veya Co^{2+} ikamesinin HA'nın kristal yapısı üzerindeki etkisi incelenmiştir. SBF'den elde edilen tozların fizikokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bifonksiyonel katman olan APTES'in Ti yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bağlanma katmanında bulunan reaktif uç amin grupları amid bağlarının oluşturulması sayesinde f MWCNT yapısında negatif yüklü fonksiyonel grupları taşıyan biyofonksiyonel f MWCNT/katkılı HA kompozit kaplamasının kovalent bağlanması için kullanılmıştır. Böylece oksijen grupları içeren MWCNT ve katkılı HA'dan oluşan kompozit alkali işlem görmüş ve APTES ile fonksiyonellendirilmiş Ti yüzeyine kovalent olarak kaplanmıştır. Hazırlanan HA ve kompozit kaplamaların FTIR, Raman, XRD, temas açısı ve yüzey enerjileri değerlendirilmiştir.

Kanser tedavisine yönelik uyarana duyarlı akıllı ilaç dağıtım sistemi olarak NCQDs bazlı enjekte edilebilir kendiliğinden çapraz bağlanan ve yerinde oluşan yeni çok fonksiyonlu hidrojel çalışmasında kanser tedavilerinde kullanılmak üzere yeni bir enjekte edilebilir, pH'a duyarlı ve yerinde oluşan akıllı ilaç dağıtım sistemi geliştirmek için kolay bir yaklaşım sunulmuştur. NCQD, Dox ve HA içeren geliştirilmiş hidrojeller yerinde kendi kendine çapraz bağlanma yoluyla elde edilmiştir. Sentezlenen nanomalzemelerin karakterizasyonu, bileşenler ve NCQD/Dox/HA hidrojel yapısı arasındaki etkileşimler TEM, FESEM, EDS, FTIR, XPS, XRD, Zeta potansiyeli, DLS, UV-Vis, SEM, jelleşme süresi, enjekte edilebilirlik ve DST ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Ek olarak *S. aureus*'a karşı antibakteriyel değerlendirme yapılmıştır ve HA bileşiği hibrit hidrojelin antibakteriyel aktivitesini önemli ölçüde arttırmıştır. Tümör hücresi mikro-ortamını taklit eden pH değeri 5.5 olan ortama antikanser ilaç salınımının pH 6,5 ve 7,4'ün değerlerindeki yani normal fizyolojik aralığındaki salınımına kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur. MTT

hücre deneyleri NCQDs'nin ve NCQDs/Dox/HA hidrojenlerinin sitotoksik davranışını araştırmak için L929 fibroblastik hücre çizgileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NCQDs/Dox/HA hidrojenli MCF-7 kanserli hücresi içinde Dox'u spesifik olarak asidik pH'ta iletebilmiştir. NCQDs kullanılarak hücre hattı görüntülenmiştir ve görüntüleme uygulamalarındaki kullanımları ile canlı hücre sistemindeki çok renkli özellikleri değerlendirilmiştir. Yenilikçi ve çok fonksiyonlu ilaç dağıtım sistemi olan NCQDs/Dox/HA hidrojenli gelecekteki akıllı ilaç teslimi ve hastalık tedavisi uygulamaları için ilgi çekici bir minimal invaziv malzeme olarak ümit vaat etmektedir.

Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak HA'nın mikrodalga destekli biyomimetik sentezi çalışmasından elde edilen genel değerlendirme şu şekilde özetlenebilir:

- Mikrodalga destekli biyomimetik HA ve bifazik TCP/HA nanokristalleri hem kalsiyum ve fosfat kaynağı olan hem de olmayan 1,5xSBF'de sentezlenmiştir.
- SEM görüntüleri morfolojilerin ve partikül boyutlarının farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak değiştiğini göstermiştir. 1,5xSBF çözeltisine kalsiyum kaynağı olarak CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ilavesiyle homojen altıgen çubuk benzeri yapılar elde edildiği ortaya koyulmuştur. Daha küçük partikül boyutlu toz ve küre benzeri morfoloji herhangi bir kalsiyum ve fosfat kaynağı ilavesi olmadan elde edilmiştir. Numune-1'de tozların dikkate değer şekilde topaklanması da gözlemlenmiştir.
- EDS alan analizi sonuçları Numune-2 ve 4'teki Ca/P oranının kemik yapısındaki HA'nın oranı olan 1,5 oranına en yakın olduğunu göstermiştir. Cl elementi EDS ile tespit edilmiştir ve özellikle Numune-3'teki yüksek miktarda Cl'un HA kristal yapısının içinde olabileceğini XRD'ye ek olarak EDS analizi göstermektedir.
- XRD paternleri Numune-1'in bifazik HA ve TCP fazlarına sahip olduğunu gösterirken Numune-2'nin monofaz HA yapısında olduğunu göstermiştir. Numune-3 ve 4'ün klor katkılı HA ve TCP fazları olduğu gözlemlenmiştir.
- Numunelerin kristal boyutu, kristal yoğunluğu ve kristaliniteleri XRD verileri kullanılarak hesaplanmıştır. X_c değerleri Numune-1 için artarken Numune-4 için azaldığı bulunmuştur. Numunelerin kristal boyutu kalsiyum

kaynaklarından belirgin şekilde etkilenmemiştir ve en düşük kristal boyutu Numune-4'te gözlemlenmiştir. Numunelerin kristal yoğunluklarının $3,15 \text{ g/cm}^3$ ile $3,31 \text{ g/cm}^3$ arasında değiştiği gözlemlenmiştir.

- Numunelerin Raman ve FTIR spektrumu XRD analizini doğrulamıştır.
- Klor ile süstitüe edilmiş HA sentezi için 1,5xSBF'de Ca(OH)_2 ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 'ün kullanılmasının uygun olduğu gösterilmiştir. Ca(OH)_2 , $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ başlangıç malzemelerinin kalsiyum ve fosfat kaynağı olarak kullanılmasıyla hegzagonal HA elde edilmiştir. Bifazik TCP/HA hem CaCl_2 ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ tarafından hem de 1,5xSBF'de herhangi bir ilave kalsiyum ve fosfat kaynağı kullanılmadan elde edilmiştir.
- Numune-4'ün içerdiği klor varlığı en düşük parçacık boyutu ve kristallik, uygun Ca/P oranı, biyoaktivite için bifazik yapı ve osteoblast çoğalması gibi genel özelliklerinden dolayı biyomalzeme olarak ümit verici olduğu iddia edilebilir. Numune-2'nin iki fazlı olması, Numune-3'teki klor varlığı ve her iki numunenin altıgen morfolojiye sahip olmaları nedeniyle Numune-2 ve 3 aday biyomateryaller olarak düşünülebilir.
- HA kaplamaların Ti bazlı implantlar üzerinde osteointegrasyon etkisi olduğu bilinmektedir [314] bu etki mikrodalga destekli kaplamalar için de söz konusudur [315]. Numune-4 diğer numunelere kıyasla daha küçük bir boyuta sahiptir. Küçük partiküllü biyomalzemelerin büyük partiküllere kıyasla daha iyi biyoaktiviteye sahip oldukları bilindiğinden [316] mikrodalga destekli kaplamalarla osteointegrasyon ve osteoblast çoğalmasının artacağı ve klinik uygulamadaki kemik greft ikamelerinin Numune-4 kullanılarak yapılabileceği düşünülmektedir.
- Mikrodalga destekli biyomimetik HA sentez yönteminin literatürde çok nadir uygulandığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma fazlar, kristallik ve boyutlar gibi farklı özelliklerde HA elde etmek için bu sentez yönteminin başarıyla kullanıldığını göstermiştir. Ayrıca raporumuzun sonuçları muhtemelen biyomimetik mikrodalga destekli kaplama yöntemi ile biyomalzemenin elde edilmesi için Ti bazlı implant yüzeyinde farklı özelliklere sahip HA fazlarının birikmesine yol açacağı düşünülmektedir.

Grafen oksidin indirgenmesinin HA ve TCP oluşumuna olan etkisi çalışmasından elde edilen genel değerlendirme şu şekilde özetlenebilir:

- RGO-HA/TCP hibrit kompozitler farklı indirgeme oranlarında SBF’de biyomimetik mineralizasyon yoluyla başarıyla sentezlenir.
- Hummer ve Offeman yöntemi ile hazırlanan GO nanopartikülleri biyomimetik mineralizasyonu gerçekleştirmek için 3 hafta boyunca 37°C’de ve 7,4 pH’ta 5xSBF’ye batırılmadan önce farklı NaBH₄ oranlarıyla indirgenmiştir.
- GO, R1GO, R2GO ve R3GO’nun nötr pH’daki zeta potansiyelleri sırasıyla -35,05, -30,01, -29,5, -29,01 ve -28,9 idi.
- Optik tansiyometre ile belirlenen GO, R1GO, R2GO ve R3GO temas açıları sırasıyla 33,5°, 55,3°, 57,4° ve 61,1°’dir.
- Raman tarafından belirlenen I_D/I_G değerleri GO, R1GO, R2GO ve R3GO için sırasıyla 1,01, 1,02, 1,04 ve 1,07’dir.
- İndirgeme işleminden sonra UV-Vis tarafından doğrulanan 254 nm’deki maksimum tepe noktası NaBH₄ ile indirgenme sonrası R1GO, R2GO ve R3GO için sırasıyla 260, 264 ve 267 nm’ye kaydırılmıştır.
- İki fazlı HA/TCP varlığı ve GO’nun indirgenmesi XRD analizi ile doğrulanmıştır. Biyomineralizasyon öncesi GO tabakaları önce RGO tabakalarına kıyasla buruşuk tabaka benzeri bir yapı ve azaltılmış yanal boyut göstermiştir.
- GO’nun belirli bir oranda (R2GO) indirgenmesi HA/TCP oluşumu üzerinde olumlu bir etkiye sahipken XRD, FTIR ve TGA analizleriyle teyit edilen aşırı indirgenme durumunda ise olumsuz etkiye sahiptir.
- Karboksil gruplarının hidroksil gruplarına indirgenmesiyle biyomineralizasyonun arttığı bulunmuştur. Aşırı indirgenme hidroksil gruplarının azalmasıyla sonuçlanmıştır ve bu nedenle biyomineralizasyon hızında azalmaya yol açmıştır.
- Bu çalışma, doku mühendisliği alanındaki biyomalzemelerin hazırlanmasına yönelik biyomineralizasyon sürecinin kısaltılabileceğini göstermiştir.

Ti üzerinde biyomimetik yöntemle HA oluşumunda ön yüzey işlemlerin karşılaştırılması çalışmasından elde edilen genel değerlendirme şu şekilde özetlenebilir:

- Apatit çekirdeklenmesini homojen hale getirmek ve gerekli bir TiO_2 tabakası oluşturmak için 1,5xSBF içerisinde gerçekleşen biyomimetik kaplamada NaOH ön yüzey işlemi diğer ön yüzey işlemleri olan HCl ve NaOH+HCl işlemlerine kıyasla daha üstündür.
- İlk haftada gerçekleştirilen SEM ve EDS analizleri sonrası optimum ön yüzey işlemleri Ti yüzeyi 4. haftaya dek 1,5xSBF’de tutulmaya devam etmiştir. Kalsiyum ve fosfat iyonlarından oluşan tabakanın ikinci haftadan dördüncü haftaya kadar katman katman arttığı görülmüştür.
- Dördüncü haftanın sonunda 1,5xSBF’de kaplanmış bifazik HA tozlarının Ca/P oranı 1,3 olarak bulunmuştur.
- 1 saat boyunca $600^{\circ}C$ ’deki ısı işlem sonrasında NaOH ön yüzey işlemleri Ti yüzeyinde HA oluşumunu desteklediği bilinen TiO_2 tabakasının diğer ön yüzey işlemleri Ti plakalarına kıyasla daha fazla oluştuğu analiz edilmiştir.
- Ön yüzey işlemi ardından elde edilen $|Z|$ değerleri Nyquist grafikleri ile uyumlu olarak şu sıra ile artmaktadır: NaOH+HCl<HCl<NaOH. NaOH ön yüzey işlemleri Ti numuneleri SBF çözeltisinde daha düşük bozunma hızına ve HCl ön yüzey işlemleri numunelere kıyasla iyon salınımını önleyen yüzeye sahiptir.
- Kaplanmış katmanların $950^{\circ}C$ ’de sinterlenmesinden önce ve sonra elde edilen Raman ve FTIR sonuçları XRD verilerinden hesaplanan kristalinite ile uyum içindedir.
- Sinterlenmiş bifazik HA tozunun ortalama parçacık boyutu 2,36 ve 46,32 μm arasında değişirken sinterlenmiş olan bifazik HA tozunun ortalama parçacık boyutu 0,58 μm ’dir.
- Bifazik (HA ve β -TCP) kemik tozundan oluşan biyotabakanın kaplama kalınlığı optimum seçilmiş alkali işlem ile muamele edilmiş Ti yüzeyinin 1,5xSBF yerleştirilmesi sonrası başarıyla artırılmıştır.

- Herhangi bir ilave kalsiyum ve fosfat kaynağı olmayan 1,5xSBF’de kemikteki apatit yapısındaki benzer olan kaplama tabakası biyomimetik olarak başarılı bir şekilde olmuştur.

Kemik doku mühendisliği için 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA kompozit yapı iskeleleri çalışmasından elde edilen genel değerlendirme şu şekilde özetlenebilir:

- Bu çalışmada, yeni bir yapay yüksek gözenekli (>%95) 3B Col/fMWCNT/CS/HA kemik yapı iskelesinin geliştirilmesi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.
- İnsan kemiğinin organik ve inorganik yapısını oluşturan fazlar sırasıyla Col ve HA fazları olduğundan dolayı diğer çalışmalarda kullanılan CS tabanlı iskele yerine [242, 317] Col bazlı yapı iskelesi kullanılmış ve ek olarak HA yüzeyde birikmiştir.
- Çalışma sonuçları kimyasal olarak fonksiyonellendirilmiş MWCNT ve CS ile modifiye edilmiş Col’den oluşan ve liyofilizasyon ile elde edilen yapı iskelelerinin kemik doku mühendisliği için uygun özelliklerde olduğu bulunmuştur. Elde edilen 3B gözenekli Col, CS, Col/fMWCNT ve Col/fMWCNT/CS yapı iskelelerinin özellik ve yapı ilişkisinin karşılaştırmalı bir değerlendirmesini açıklamaktadır.
- 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS yapı iskelesinin biyomineralizasyonu incelenmiştir ve in-vitro biyomimetik yöntemle konsantr SBF çözeltisi içinde yapı iskelesinin yüzeyinde HA çekirdeklenmiştir. XRD ($31,9^{\circ}2'$ ’daki (211) piki latis sabitleri $a=b=9,418$ ve $c=6,884$ Å olan hegzagonal HA’ya karşılık gelmektedir), FTIR ($1017, 962, 592$ ve 468 cm^{-1} ’deki pikler PO_4^{3-} ’nin ν_3, ν_1, ν_4 ve ν_2 gerilme modlarına karşılık gelmektedir), SEM ve Optik mikroskop karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve çökeltinin kemik benzeri apatitten oluştuğu gözlemlenmiştir.
- Kemik dokusundaki ECM’nin özellikleri taklit etmek bağlantılı poroz yapıdan ($\%95,7 \pm 0,1$ gözeneklilik ve $20-350$ μm gözenek büyüklüğü) dolayı in-vitro biyoaktivite (SEM, Optik mikroskop, FTIR ve XRD sonuçlarından görülebileceği gibi) ve artmış mukavemet (524 kPa’dan 1112 kPa’ya)

sergileyen 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS kompozit yapı iskelesi geliştirilmiştir.

- Elde edilen 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA iskeleleri artan hidrofilitikle (87,8°'den 76,7°'ye) birlikte Col (211 kPa), CS (284 kPa) Col/fMWCNT (311 kPa) ve Col/fMWCNT/CS (524 kPa) yapı iskeleleri ile karşılaştırıldığında geliştirilmiş mekanik özellik (1112 kPa) sergilemiştir.
- 3B gözenekli Col/fMWCNT/CS/HA iskeleleri iyi PBS emilimi (481,05±%25) dâhil olmak üzere çeşitli sinerjik etkiler göstermiştir ve kemik doku mühendisliği alanındaki yüksek biyoaktif yapı iskelelerinin gelecekteki uygulamalarında bir yere sahip olacağına inanılmaktadır.

Yeni m-5xSBF'de monofazik brushitin Ti6Al4V üzerine biyomimetik yöntemle kaplaması çalışmasından elde edilen genel değerlendirme şu şekilde özetlenebilir:

- Monofazik HA ve brushit Ti6Al4V üzerine başarıyla biyomimetik olarak yerleştirilmiştir.
- Bu çalışma ilk kez yenilikçi m-5xSBF çözeltisinin kemik oluşumunda önemli olan monofazik brushit biyoseramiğinin biyolojik koşullarda farklı şekillerdeki implant malzemelerine uygulanmasına izin verdiğini bildirmiştir.
- m-5xSBF'de kolayca uygulanabilen biyomimetik yöntem kullanılarak elde edilen monofazik brushit kaplı implantların diğer CaP biyoseramik kaplı implantlara kıyasla in-vivo kemik yenilenmesini hızlandıracağına inanılmaktadır.

Çözelti ve kalsinasyon süresinin sol-jel HA sentezi üzerine etkisi çalışmasından elde edilen genel değerlendirme şu şekilde özetlenebilir:

- HA numuneleri, farklı proses parametreleriyle hem sulu hem de alkollü çözeltilerde başarıyla sentezlenmiştir.
- En düşük kristallik HA2 numunesinde 0,92, en yüksek kristallik HA6 numunesinde 1,73 olarak bulunmuştur.

- Kemiğe en yakın Ca/P atom oranı 1,518 olarak HA6 numunesinde görülmüştür.
- Sentez işleminden sonra çözelti ortamı ve kalsinasyon süresine bağlı olarak baskın HA fazı ile birlikte az miktarda CaO ve Ca(OH)₂ fazları da elde edilmiştir.
- Parametrelerinden biri olan kalsinasyon süresi su bazlı çözelti içinde baskın elde edilen HA bileşiğinin saflığını önemli derecede etkilemektedir.
- Kalsiyum hidroksit ve fosforik asit kaynakları ile pH=11’de gerçekleştirilen HA sentezi için su bazlı çözücüde 950°C’de 1 saatlik kalsinasyon süresinin en uygun olduğu bulunmuştur.

Ag, Zn veya Co katkılı HA’nın biyomimetik sentezi ve fonksiyonel Ti üzerinde Ag, Zn veya Co katkılı HA/fMWCNT kompozitinin kaplanması çalışmasından elde edilen genel değerlendirme şu şekilde özetlenebilir:

- Katkılı ve Ag, Zn veya Co katkılı HA tozları c-SBF kullanılarak yüksek sıcaklıkta işlem yapmadan biyomimetik yöntemle tek bir adımda başarıyla sentezlenmiştir.
- Oksijen içeren hidrofilik gruplar (-COOH, -OH ve -C=O) MWCNT’lerin yüzeyine kazandırılmıştır.
- Sentezlenen HA’ların elektrostatik çekim ile fMWCNT’lere yönlendirilmesi fMWCNT ve HA arasında sıkı bir arayüzey ve kimyasal bağlanma ile sonuçlanmıştır.
- Silan ile muamele edilmiş Ti’deki çapraz bağlanmış kompozit kaplamanın çapraz bağlanmamış kompozit kaplamaya göre daha yüksek bir yapışma kuvvetine sahiptir.
- fMWCNT ve HA kullanılarak Ti yüzeyinin biyomimetik kaplanması HA içeren Col fibrillerinden meydana gelen insan kemiğini taklit etmektedir.
- Silan fonksiyonellendirilen Ti yüzeyinde fMWCNT/katkılı HA kompozit kaplama faydalı, özel yöntemler gerektirmeyen, gerçekleştirme kolaylığı sunan ve düşük sentez maliyetine sahip bir biyokaplama olduğu için işlem görmemiş

Ti'ye kıyasla implant özelliklerini geliştirmek için kolayca uygulanabilir yüzey biyomodifikasyonu açılarından umut vericidir.

- Katkılanmamış ve katkılanmış HA'ların hücre değerlendirme MTT testi ile gerçekleştirilmiş ve hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etki gözlenmemiştir.

Kanser tedavisine yönelik uyarana duyarlı akıllı ilaç dağıtım sistemi olarak NCQDs bazlı enjekte edilebilir, kendiliğinden çapraz bağlanan ve yerinde oluşan yeni çok fonksiyonlu hidrojel çalışmasından elde edilen genel değerlendirme şu şekilde özetlenebilir:

- Dox'u verimli bir şekilde taşınması için yeni bir enjekte edilebilir pH duyarlı NCQD/Dox/HA hidrojel akıllı ilaç dağıtım sistemi geliştirilmiştir. Bileşenleri arasındaki Schiff bazı, iyonik ve H-bağ etkileşimleri kombinasyonu yoluyla Kendi kendine çapraz bağlanan hidrojel fizyolojik koşullarda yerinde üretilmiştir.
- Biyoaktif HA'ya sahip enjekte edilebilir ve kovalent bağlı NCQDs bazlı hidrojinin yerinde jelleşmeyle başarıyla gerçekleştirildiği gözlemlenmiştir ve bu nedenle vücut sıcaklığında uygun bir enjekte edilebilirliğe sahiptir.
- Schiff bazı ve HA'nın asitlik hassasiyeti Dox konjuge hidrojellerinden farklı pH'larda oldukça hassas bir ilaç salınım profili sergilemesi MTT testi, UV-Vis spektrometrisi ve floresan mikroskop görüntüleri ile doğrulanmıştır.
- Enjekte edilebilir akıllı ilaç taşıyıcı hidrojel NCQDs-Dox arasındaki Schiff bazı reaksiyonu ve NCQDs-HA ve Dox-HA arasındaki iyonik etkileşimler yoluyla jelleştirilmesi NCQDs bazlı hibrit hidrojel içine ilaç yüklemek için yeni bir yöntem sunmaktadır.
- NCQDs/Dox/HA dokuların taklit edildiği ortamda hem zamana hem de pH'a bağlı ilaç salınımını göstermiştir. pH duyarlı hazırlanan hidrojel kanserli dokulardaki nispeten düşük pH'tan dolayı ilacın normal dokulardaki yan etkisini azalttığından kemoterapi için faydalı olacağı düşünülmektedir.
- NCQDs/Dox/HA hibritlerinin *S. aureus*'a karşı güçlü in-vitro antibakteriyel özellik sergilediği gözlemlenmiştir.

- Hidrojellerden salınan Dox'un in-vitro etkinliği ve sitotoksitesisi L929 ve MCF-7 hücreleri ile incelenmiş ve hidrojellerin sitotoksik etkisi gözlenmemiştir.
- Hidrojeller doğal pH'da MCF-7 hücreleri için toksik değilken asidik pH'da hidrojellerden salınan Dox etkili bir şekilde hücre ölümüne neden olmuştur ve akıllı ilaç dağıtım sistemi olarak iyi bir potansiyel göstermiştir.
- Bilindiği kadarıyla ilaç nanotaşıyıcıları olarak ve/veya Dox'un taşınımı için NCQDs bazlı pH duyarlı ve enjekte edilebilir NCQDs/Dox/HA hidrojel akıllı ilaç dağıtım sistemleri ile ilgili açık literatürde daha önce bir çalışma sunulmamıştır. Genel olarak elde edilen sonuçlar enjekte edilebilir pH duyarlı akıllı NCQDs/Dox/HA hidrojellerinin yeni bir pencere sunması ve daha iyi bir yaşam kalitesi için gelecekteki klinik uygulamalara dâhil edilebilir olmasından dolayı bir sonraki adım olarak gerçekleştirilmesi planlanan in-vivo antitümör tedavisi için umut verici bir nanoterapötik ajan olduğunu göstermiştir.

Bu çalışma sonunda ileride üzerinde araştırma yapılması için öneriler:

- Mikrodalga destekli biyomimetik yöntem ile elde edilen Numune-4'e ait nano boyutlu HA aynı zamanda sentez ve kaplama aşamaları birleştirilebilir ve farklı substratlar üzerine kaplanması çalışmayı ileri seviyeye taşıyabilir.
- Biyomimetik yöntemle gerçekleştirilmiş olan Ti ve Ti6Al4V yüzey kaplamalarına katılanmış iyonların salınımı ve ilaç ilave edilmesiyle ilaç salınım özellikleri ayrıca incelenerek biyomimetik yöntem ve ilaç yüklenmesi birleştirilerek literatüre ek bilgi sağlanabilir.
- Yapı iskelelerinin hidrojel formları kullanılarak Ti veya Ti6Al4V gibi bir substrat üzerinde liyofilizasyonla katman-katman poroz bir şekilde elde edilmesi amaçlanan bir kaplama çalışması denenebilir. Eğer farklı katmanlardan oluşan kaplamalar liyofilizasyonla poroz bir şekilde kaplanması gerçekleştirilirse yük taşıyıcı kemik ikameleri olarak incelemeler gerçekleştirilebilir. Ayrıca katmanlar arasındaki bölgeye olacak olan ilaç yükleme çalışmasıyla araştırma genişletilebilir.

- Biyomimetik yöntemle sol-jel yönteminin birleştiği art arda gelen sentez basamaklarını içeren bir deney tasarlanabilir. Böylece hem yenilikçi hem de sol-jel ile biyomimetik yöntemin avantajları kullanılabilir.
- Hayvan deneyleri için etik izinlerin alınması mümkün olursa sentezlenen yapı iskelelerinin süngerimsi kemik dokularıyla olan uyumluluklarının ve sentezlenen hidrojellerin in-vivo tümör dokuları ortamına etkilerinin araştırılmaları gerçekleştirilebilir ve in-vitro incelemeler bir adım ileriye taşınmış olur.

şeklinde özetlenebilir

KAYNAKLAR

- [1] Türk, S., Altınsoy, İ., Çelebi Efe, G., Ipek M., Özacar, M., Bindal, C. 2017. Microwave–assisted biomimetic synthesis of hydroxyapatite using different sources of calcium. *Mater. Sci. Eng. C*, 76 (2017): 528–535.
- [2] Türk, S., Altınsoy, İ., Çelebi Efe, G., Ipek M., Özacar, M., Bindal, C. 2018. The effect of reduction of graphene oxide on the formation of hydroxyapatite and tricalcium phosphate. *Vacuum*, 148 (2018): 1–10.
- [3] Türk, S., Altınsoy, İ., Çelebi Efe, G., Ipek M., Özacar, M., Bindal, C. 2018. A comparison of pretreatments on hydroxyapatite formation on Ti by biomimetic method. *J. Aust. Ceram. Soc.*, 54 (2018): 533–543.
- [4] Türk, S., Altınsoy, İ., Çelebi Efe, G., Ipek M., Özacar, M., Bindal, C. 2018. 3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C*, 92 (2018): 757–768.
- [5] Türk, S., Altınsoy, İ., Çelebi Efe, G., Ipek M., Özacar, M., Bindal, C. 2018. Biomimetic coating of monophasic brushite on Ti6Al4V in new m-5xSBF. *Surf. Coatings Technol.*, 351 (2018): 1–10.
- [6] Türk, S., Altınsoy, İ., Çelebi Efe, G., Ipek M., Özacar, M., Bindal, C. 2019. Effect of solution and calcination time on sol – gel synthesis of hydroxyapatite. *J. Bionic. Eng.*, 16 (2019): 311–318.
- [7] Türk, S., Altınsoy, İ., Çelebi Efe, G., Ipek M., Özacar, M., Bindal, C. 2019. Biomimetic synthesis of Ag , Zn or Co doped HA and coating of Ag , Zn or Co doped HA / f MWCNT composite on functionalized Ti. *Mater. Sci. Eng. C*, 99 (2019): 986–998.
- [8] Li, H., Song, X., Li, B., Kang, J., Liang, C., Wang, H., Yu, Z., Qiao, Z. 2017. Carbon nanotube-reinforced mesoporous hydroxyapatite composites with excellent mechanical and biological properties for bone replacement material application. *Mater. Sci. Eng. C*, 77 (2017): 1078–1087.
- [9] Ahmadzadeh, E., Talebnia, F., Tabatabaei, M., Ah-, H., Mostaghaci, B., Farid, T., Meisam, T., Hossein, A., Babak, M. 2016. Osteoconductive composite graft based on bacterial synthesized hydroxyapatite nanoparticles doped with

different ions: From synthesis to in vivo studies. *Nanomedicine: NBM*, 12 (5): 1387-1395.

- [10] Ziani, S., Meski, S., Khireddine, H. 2014. Characterization of magnesium-doped hydroxyapatite prepared by sol-gel process. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 11 (1): 83–91.
- [11] Pylypchuk, I.V., Gorbyk, P.P., Petranovska, A.L., Korduban, O.M., Markovsky, P.E., Ivasyshyn, O.M. 2016. *Surf. Chem. Nanobiomaterials Appl. Nanobiomaterials*. İçinde: Formation of biomimetic hydroxyapatite coatings on the surface of titanium and Ti-containing alloys: Ti-6Al-4V and Ti-Zr-Nb. 1. Baskı, William Andrew Yayınları, 193–229.
- [12] Jeong, Y.H., Kim, E.J., Brantley, W.A., Choe, H.C. 2014. Morphology of hydroxyapatite nanoparticles in coatings on nanotube-formed Ti-Nb-Zr alloys for dental implants. *Vacuum*, 107 (2014): 297–303.
- [13] Cai, Y., Liu, Y., Yan, W., Hu, Q., Tao, J., Zhang, M., Shi, Z., Tang, R. 2007. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. *J. Mater. Chem.*, 17 (2007): 3780.
- [14] Dorozhkin, S. V. 2010. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater.*, 6 (2010): 715–734.
- [15] Dong, Z., Li, Y., Zou, Q. 2009. Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. *Appl. Surf. Sci.*, 255 (2009): 6087–6091.
- [16] Wang, Y., Liu, L., Guo, S. 2010. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro. *Polym. Degrad. Stab.*, 95 (2010): 207–213.
- [17] Sadat-Shoja, M. i, Khorasani, M.T. 2013. Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A. 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.*, 9 (2013): 7591–7621.
- [18] Vallet-Regí, M., González-Calbet, J.M. 2004. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog. Solid State Chem.*, 32 (2004): 1–31.
- [19] Liu, D.M., Troczynski, T., Tseng, W.J. 2001. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials*, 22 (2001): 1721–1730.
- [20] Liou, S.C., Chen, S.Y., Lee, H.Y., Bow, J.S. 2004. Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders. *Biomaterials*, 25 (2004): 189–196.
- [21] Zhou, H., Lee, J. 2011. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.*, 7 (2011): 2769–2781.

- [22] Zanin, H., Saito, E., Marciano, R., Ceragioli, J. 2013. Fast preparation of nano-hydroxyapatite/ superhydrophilic reduced graphene oxide composites for bioactive applications. *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013): 4947–4955.
- [23] Roveri, N., Iafisco, M. 2010. Evolving application of biomimetic nanostructured hydroxyapatite. *Nanotechnol. Sci. Appl.*, 3 (2010): 107–125.
- [24] Chen, J., Wang, Y., Chen, X., Ren, L., Lai, C., He, W., Zhang, Q. 2011. A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders. *Mater. Lett.*, 65 (2011): 1923–1926.
- [25] Dorozhkina, E.I., Dorozhkin, S. V. 2002. Mechanism of the solid-state transformation of a calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA) into biphasic calcium phosphate (BCP) at elevated temperatures. *Chem. Mater.*, 14 (2002): 4267–4272.
- [26] Li, Y., Kong, F., Weng, W. 2009. Preparation and characterization of novel biphasic calcium phosphate powders (α -TCP/HA) derived from carbonated amorphous calcium phosphates. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 89B (2009): 508–517.
- [27] Maidaniuc, A., Batalu, D., Berbecaru, A., Ioan, S., Miculescu, M., Kumar, V., Toma, L. 2017. Facile synthesis and characterization of hydroxyapatite particles for high value nanocomposites and biomaterials. *Vacuum*, 146 (2017): 614–622.
- [28] Descamps, M., Boilet, L., Moreau, G., Tricoteaux, A., Lu, J., Leriche, A., Lardot, V., Cambier, F. 2013. Processing and properties of biphasic calcium phosphates bioceramics obtained by pressureless sintering and hot isostatic pressing. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 33 (2013): 1263–1270.
- [29] Yoganand, C.P., Selvarajan, V., Wu, J., Xue, D. 2009. Processing of bovine hydroxyapatite (HA) powders and synthesis of calcium phosphate silicate glass ceramics using DC thermal plasma torch. *Vacuum*, 83 (2009): 319–325.
- [30] White, A.A., Best, S.M., Kinloch, I. 2007. Hydroxyapatite-carbon nanotube composites for biomedical applications: A review. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 4 (2007): 1–13.
- [31] Brien, F.J.O. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today*, 14 (2011): 88–95.
- [32] Gu, Y.W., Khor, K.A., Cheang, P. 2004. Bone-like apatite layer formation on hydroxyapatite prepared by spark plasma sintering (SPS). *Biomaterials*, 25 (2004): 4127–4134.

- [33] Jensen, S.S., Yeo, A., Dard, M., Hunziker, E., Schenk, R., Buser, D. 2004. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin. Oral Implants Res.*, 18 (2007): 752–760.
- [34] Arts, J.J.C., Walschot, L.H.B., Verdonschot, N., Schreurs, B.W., Buma, P. 2007. Biological activity of tri-calciumphosphate/hydroxyl-apatite granules mixed with impacted morsellized bone graft. A study in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 81 (2007): 476–485.
- [35] Ben-Arfa, B.A.E., Salvado, I.M.M., Ferreira, J.M.F., Pullar, R.C. 2016. Novel route for rapid sol-gel synthesis of hydroxyapatite, avoiding ageing and using fast drying with a 50-fold to 200-fold reduction in process time. *Mater. Sci. Eng. C*, 70 (2016): 796–804.
- [36] Lin, K., Chen, L., Qu, H., Lu, J., Chang, J. 2011. Improvement of mechanical properties of macroporous B-tricalcium phosphate bioceramic scaffolds with uniform and interconnected pore structures. *Ceram. Int.*, 37 (2011): 2397–2403.
- [37] Pina, S., Vieira, S.I., Rego, P., Torres, P.M.C., Cruz, O.A.B., Cruz, E.F., Ferreira, J.M.F. 2010. Biological responses of brushite-forming Zn- and ZnSr-substituted β -tricalcium phosphate bone cements. *Eur. Cells Mater.*, 20 (2010): 162–177.
- [38] Djosic, M.S., Panic, V., Stojanovic, J., Mitric, M., Miskovic-Stankovic, V.B. 2012. The effect of applied current density on the surface morphology of deposited calcium phosphate coatings on titanium. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 400 (2012): 36–43.
- [39] Tamimi, F., Kumarasami, B., Doillon, C., Gbureck, U., Le Nihouannen, D., Cabarcos, E.L., Barralet, J.E. 2008. Brushite-collagen composites for bone regeneration. *Acta Biomater.*, 4 (2008): 1315–1321.
- [40] Giocondi, J.L., El-Dasher, B.S., Nancollas, G.H., Orme, C.A., 2010. Molecular mechanisms of crystallization impacting calcium phosphate cements. *Phil. Trans. R. Soc. A.*, 368 (2010): 1937–1961.
- [41] Boanini, E., Gazzano, M., Bigi, A. 2010. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomater.*, 6 (2010): 1882–1894.
- [42] Landi, E., Logroscino, G., Proietti, L., Tampieri, A., Sandri, M., Sprio, S. 2008. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 19 (2008): 239–247.

- [43] Kezhi, L., Qian, G., Leilei, Z., Yulei, Z., Shoujie, L., Keping, G., Shaoxian, L., Qian, G., Leilei, Z., Yulei, Z., Shoujie, L., Keping, G., Shaoxian, L. 2017. Synthesis and characterization of Si-substituted hydroxyapatite bioactive coating for SiC-coated carbon/carbon composites. *Ceram. Int.*, 43 (1): 1410–1414.
- [44] Huang, Z., Zhou, Q., Wang, X., Liu, Z. 2016. A Biomimetic Synthesis Process for Sr^{2+} , HPO_4^{2-} , and CO_3^{2-} Substituted Nanohydroxyapatite. *Mater. Manuf. Process.*, 31 (2016): 217–222.
- [45] Govindaraj, D., Rajan, M., Munusamy, M.A., Alarfaj, A.A., Sadasivuni, K.K., Kumar, S.S. 2017. The synthesis, characterization and in vivo study of mineral substituted hydroxyapatite for prospective bone tissue rejuvenation applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 13 (2017): 2661–2669.
- [46] Šupová, M. 2015. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram. Int.*, 41 (2015): 9203–9231.
- [47] Iafisco, M., Ruffini, A., Adamiano, A., Sprio, S., Tampieri A. 2014. Biomimetic magnesium-carbonate-apatite nanocrystals endowed with strontium ions as anti-osteoporotic trigger. *Mater. Sci. Eng. C*, 35 (2014): 212–219.
- [48] Yuan, X., Zhu, B., Tong, G., Su, Y., Zhu, X. 2013. Wet-chemical synthesis of Mg-doped hydroxyapatite nanoparticles by step reaction and ion exchange processes. *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013): 6551.
- [49] Kim, E.S., Jeong, Y.H., Choe, H.C., Brantley, W.A. 2014. Preparation of silicon-substituted hydroxyapatite coatings on Ti-30Nb-xTa alloys using cyclic electrochemical deposition method. *Thin Solid Films*, 572 (2014): 99–104.
- [50] Zhou, H., Kong, S., Pan, Y., Zhang, Z., Deng, L. 2015. Microwave-assisted fabrication of strontium doped apatite coating on Ti6Al4V. *Mater. Sci. Eng. C*, 56 (2015): 174–180.
- [51] Rameshbabu, N., Sampath Kumar, T.S., Prabhakar, T.G., Sastry, V.S., Murty, K.V.G.K., Prasad Rao, K. 2007. Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization. *J. Biomed. Mater. Res.*, 80A (2007): 581–591.
- [52] Radovanović, Ž., Jokić, B., Veljović, D., Dimitrijević, S., Kojić, V., Petrović, R., Janačković, D. 2014. Antimicrobial activity and biocompatibility of Ag^+ - and Cu^{2+} -doped biphasic hydroxyapatite/a-tricalcium phosphate obtained from hydrothermally synthesized Ag^+ - and Cu^{2+} -doped hydroxyapatite. *Appl. Surf. Sci.*, 307 (2014): 513–519.

- [53] Chozhanathmisra, M., Ramya, S., Kavitha, L., Gopi, D. 2016. Development of zinc-halloysite nanotube/minerals substituted hydroxyapatite bilayer coatings on titanium alloy for orthopedic applications. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 511 (2016): 357–365.
- [54] Jankovi, A., Ristoscu, C., Duta, L., Serban, N., Visan, A., Mihailescu, I.N. 2014. Antifungal activity of Ag: hydroxyapatite thin films synthesized by pulsed laser deposition on Ti and Ti modified by TiO₂ nanotubes substrates. *Appl. Surf. Sci.*, 293 (2014): 37–45.
- [55] Esfahani, H., Salahi, E., Tayebifard, A., Rahimipour, M.R., Keyanpour-Rad, M. 2016. Structural and morphological analysis of zinc incorporated non-stoichiometric hydroxyapatite nano powders. *Rev. Mater.*, 21 (2016): 569–576.
- [56] Batra, U., Kapoor, S. 2016. Ionic substituted hydroxyapatite scaffolds prepared by sponge replication technique for bone regeneration. *Nanosci. Nanotechnol.*, 6 (2016): 18–24.
- [57] Kramer, E., Itzkowitz, E., Wei, M. 2014. Synthesis and characterization of cobalt-substituted hydroxyapatite powders. *Ceram. Int.*, 40 (2014): 13471–13480.
- [58] Anjaneyulu, U., Swaroop, V.K., Vijayalakshmi, U. 2016. Preparation and characterization of novel Ag doped hydroxyapatite–Fe₃O₄–chitosan hybrid composites and in vitro biological evaluations for orthopaedic applications. *RSC Adv.*, 6 (2016): 10997–11007.
- [59] Webster, T.J., Massa-Schlueter, E.A., Smith, J.L., Slamovich, E.B. 2004. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. *Biomaterials*, 25 (2004): 2111–2121.
- [60] Ignjatovic, N., Ajdukovic, Z., Rajkovic, J., Najman, S., Mihailovic, D., Uskokovic, D. 2015. Enhanced osteogenesis of nanosized cobalt-substituted hydroxyapatite. *J. Bionic Eng.*, 12 (2015): 604–612.
- [61] Hassan, M.N., Mahmoud, M.M., El-Fattah, A.A., Kandil, S. 2016. Microwave-assisted preparation of nano-hydroxyapatite for bone substitutes. *Ceram. Int.*, 42 (2016): 3725–3744.
- [62] Niakan, A., Ramesh, S., Ganesan, P., Tan, C.Y., Purbolaksono, J., Chandran, H., Ramesh, S., Teng, W.D. 2015. Sintering behaviour of natural porous hydroxyapatite derived from bovine bone. *Ceram. Int.*, 41 (2015): 3024–3029.
- [63] Poinern, G.E.J., Brundavanam, R.K., Thi, X. Le, Nicholls, P.K., Cake, M.A., Fawcett, D. 2014. The synthesis, characterisation and in vivo study of a bioceramic for potential tissue regeneration applications. *Sci. Rep.*, 4 (6235):1–9.

- [64] Kalia, P., Vizcay-Barrena, G., Fan, J.P., Warley A., Di Silvio, L., Huang, J. 2014. Nanohydroxyapatite shape and its potential role in bone formation: an analytical study. *J. R. Soc. Interface.*, 11 (20140004): 1–11.
- [65] Leena, M., Rana, D., Webster, T.J., Ramalingam, M. 2016. Accelerated synthesis of biomimetic nano hydroxyapatite using simulated body fluid. *Mater. Chem. Phys.*, 180 (2016): 166–172.
- [66] Cao, J.M., Feng, J., Deng, S.G., Chang, X., Wang, J., Liu, J.S., Lu, P., Lu, H.X., Zheng, M.B., Zhang, F., Tao, J. 2005. Microwave-assisted solid-state synthesis of hydroxyapatite nanorods at room temperature. *J. Mater. Sci.*, 40 (2005): 6311–6313.
- [67] Bose, S., Saha, S. 2003. Synthesis of hydroxyapatite nanopowders via sucrose-templated sol–gel method. *J. Am. Ceram. Soc.*, 86 (2003): 1055–1057.
- [68] Eshtiagh-Hosseini, H., Housaindokht, M.R., Chahkandi, M. 2007. Effects of parameters of sol-gel process on the phase evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Mater. Chem. Phys.*, 106 (2007): 310–316.
- [69] Hsieh, M.F., Perng, L.H., Chin, T.S., Perng, H.G. 2001. Phase purity of sol-gel-derived hydroxyapatite ceramic. *Biomaterials*, 22 (2001): 2601–2607.
- [70] Fathi, M.H., Hanifi, A., Mortazavi, V. 2008. Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *J. Mater. Process. Technol.*, 202 (2008): 536–542.
- [71] Kikuchi, M., Ikoma, T., Itoh, S., Matsumoto, H.N., Koyama, Y., Takakuda, K., Shinomiya, K., Tanaka, J. 2004. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Compos. Sci. Technol.*, 64 (2004): 819–825.
- [72] Qin, J., Zhong, Z., Ma, J. 2016. Biomimetic synthesis of hybrid hydroxyapatite nanoparticles using nanogel template for controlled release of bovine serum albumin. *Mater. Sci. Eng. C*, 62 (2016): 377–383.
- [73] Ma, Y., Zhang, J., Guo, S., Shi, J., Du, W., Wang, Z., Ye, L., Gu, W. 2016. Biomimetic mineralization of nano-sized, needle-like hydroxyapatite with ultrahigh capacity for lysozyme adsorption. *Mater. Sci. Eng. C*, 68 (2016): 551–556.
- [74] Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T. 1990. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W³. *J. Biomed. Mater. Res.*, 24 (1990): 721–734.

- [75] Khalili, V., Khalil-Allafi, J., Frenzel, J., Eggeler, G. 2017. Bioactivity and electrochemical behavior of hydroxyapatite-silicon-multi walled carbon nanotubes composite coatings synthesized by EPD on NiTi alloys in simulated body fluid. *Mater. Sci. Eng. C*, 17 (2017): 473–482.
- [76] Azami, M., Ai, J., Ebrahimi-Barough, S., Farokhi, M., Fard, S.E. 2013. In vitro evaluation of biomimetic nanocomposite scaffold using endometrial stem cell derived osteoblast-like cells. *Tissue Cell.*, 45 (2013): 328–337.
- [77] Jeong, Y.H., Choe, H.C., Brantley, W.A. 2013. Silicon-substituted hydroxyapatite coating with Si content on the nanotube-formed Ti-Nb-Zr alloy using electron beam-physical vapor deposition. *Thin Solid Films*, 546 (2013): 189–195.
- [78] Han, L., Lin, H., Lu, X., Zhi, W., Wang, K.F., Meng, F.Z., Jiang, O. 2014. BMP2-encapsulated chitosan coatings on functionalized Ti surfaces and their performance in vitro and in vivo. *Mater. Sci. Eng. C*, 40 (2014): 1–8.
- [79] Yılmaz, E., Gökçe, A., Findik, F., Gulsoy, H.O., İyibilgin, O. 2018. Mechanical properties and electrochemical behavior of porous Ti-Nb biomaterials. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 87 (2018): 59–67.
- [80] Mohammed, H.I., Abdel-Fattah, W.I., El-Sayed, E.S.M., Talaat, M.S., Sallam, A.S.M., Faerber, J., Pourroy, G., Roland, T., Carradò, A. 2012. Influence of heat treatment on Ti6Al4V for biomimetic biolayer. *Bioinspired, Biomim. Nanobiomaterials*, 1 (2012): 173–182.
- [81] Siddharthan, A., Kumar, T.S.S., Seshadri, S.K. 2010. In situ composite coating of titania-hydroxyapatite on commercially pure titanium by microwave processing. *Surf. Coat. Technol.*, 204 (2010): 1755–1763.
- [82] Yılmaz, E., Gökçe, A., Findik, F., Özkan Gülsoy, H. 2017. Characterization of biomedical Ti-16Nb-(0–4)Sn alloys produced by powder injection molding. *Vacuum*, 142 (2017): 164–174.
- [83] Liu H. 2016. *Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration*, 1. Cilt, Woodhead Yayınları, UK, 3–385.
- [84] Gerhard, E., Wang, W., Li, C., Guo, J., Ozbolat, I., Rahn, K., Armstrong, A., Xia, J., Qian, G., Yang, J. 2017. Design strategies and applications of nacre – based biomaterials. *Acta Biomater.*, 54 (2017): 21–34.
- [85] Gao, C., Feng, P., Peng, S., Shuai, C. 2017. Carbon nanotubes, graphene and boron nitride nanotubes reinforced bioactive ceramics for bone repair. *Acta Biomater.*, 61 (2017): 1–20.

- [86] Medvecký, E., Štulajterová, R., Bureš, R. 2009. Structural evaluation of brushite/gelatine coatings on graphite substrate. *Surf. Coatings Technol.*, 203 (2009): 3754–3762.
- [87] Fornell, J., Feng, Y.P., Pellicer, E., Suriñach, S., Baró, M.D., Sort, J. 2017. Mechanical behaviour of brushite and hydroxyapatite coatings electrodeposited on newly developed FeMnSiPd alloys. *J. Alloys Compd.*, 729 (2017): 231–239.
- [88] Li, D., Lu, X., Lin, H., Ren, F. 2013. Chitosan / bovine serum albumin co-micropatterns on functionalized titanium surfaces and their effects on osteoblasts. *J. Mater Sci Mater Med.*, 24 (2013): 489–502.
- [89] Yılmaz, E., Gökçe, A., Findik, F., Gulsoy, O. 2018. Metallurgical properties and biomimetic HA deposition performance of Ti-Nb PIM alloys. *J. Alloys Compd.*, 746 (2018): 301–313.
- [90] Jiao, M.J., Wang, X.X., 2009. Electrolytic deposition of magnesium-substituted hydroxyapatite crystals on titanium substrate. *Mater. Lett.*, 63 (2009): 2286–2289.
- [91] De Assis, C.M., De O. Vercik, L.C., Dos Santos, M.L., Fook, M.V.L., Guastaldi, A.C. 2005. Comparison of crystallinity between natural hydroxyapatite and synthetic cp-Ti/HA coatings. *Mater. Res.*, 8 (2005): 207–211.
- [92] Bracci, B., Torricelli, P., Panzavolta, S., Boanini, E., Giardino, R., Bigi, A. 2009. Effect of Mg^{2+} , Sr^{2+} , and Mn^{2+} on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings. *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009): 1666–1674.
- [93] Hoppe, A., Will, J., Detsch, R., Boccaccini, A.R., Greil, P. 2014. Formation and in vitro biocompatibility of biomimetic hydroxyapatite coatings on chemically treated carbon substrates. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 102 (2014): 193–203.
- [94] Bigi, A., Fini, M., Bracci, B., Boanini, E., Torricelli, P., Giavaresi, G., Aldini, N.N., Facchini, A., Sbaiz, F., Giardino, R. 2008. The response of bone to nanocrystalline hydroxyapatite-coated Ti13Nb11Zr alloy in an animal model. *Biomaterials*, 29 (2008): 1730–1736.
- [95] Chou, Y., Chiou, W., Xu, Y., Dunn, J.C.Y., Wu, B.M. 2004. The effect of pH on the structural evolution of accelerated biomimetic apatite. *Biomaterials*, 25 (2004): 5323–5331.
- [96] Yang, F., Wolke, J.G.C., Jansen, J.A. 2008. Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering. *Chem. Eng. J.*, 137 (2008): 154–161.

- [97] Zhang, C., Zhang, W., Yao, H., Zhu, H., Mao, L., Yu, S. 2013. Bioinspired Crystallization of continuous calcium phosphate films on a langmuir monolayer of zein protein : their mechanical performance, hydrophilicity, and biocompatibility. *Cryst. Growth Des.*, 13 (2013): 3505–3513.
- [98] Adawy, A., Abdel-Fattah, W.I. 2013. An efficient biomimetic coating methodology for a prosthetic alloy. *Mater. Sci. Eng. C*, 33 (2013): 1813–1818.
- [99] Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., Amouriq, Y. 2007. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.*, 23 (2007): 844–854.
- [100] Lincks, J., Boyan, B.D., Blanchard, C.R., Lohmann, C.H., Liu, Y., Cochran, D.L., Dean, D.D., Schwartz, Z. 2006. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomater. Silver Jubil. Compend.*, 19 (2006): 147–160.
- [101] Amanov, A., Pyun, Y.-S. 2017. Local heat treatment with and without ultrasonic nanocrystal surface modification of Ti-6Al-4V alloy: Mechanical and tribological properties. *Surf. Coatings Technol.*, 326 (2017): 343–354.
- [102] Liu, Q., Li, W., Cao, L., Wang, J., Qu, Y., Wang, X., Qiu, R., Di, X., Wang, Z., Liang, B. 2017. Response of MG63 osteoblast cells to surface modification of Ti-6Al-4V implant alloy by laser interference lithography. *J. Bionic Eng.*, 14 (2017): 448–458.
- [103] Pop-Georgievski, O., Kubies, D., Zemek, J., Neykova, N., Demianchuk, R., Chánová, E.M., Šlouf, M., Houska, M., Rypáček, F. 2015. Self-assembled anchor layers/polysaccharide coatings on titanium surfaces: A study of functionalization and stability. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 6 (2015): 617–631.
- [104] Silva, E.E., Della Colleta, H.H.M., Ferlauto, A.S., Moreira, R.L., Rodrigo, R., Oliveira, S., Kitten, G.T., Lacerda, R.G. 2009. Nanostructured 3-D collagen / nanotube biocomposites for future bone regeneration scaffolds. *Nano Res.*, 2 (2009): 462–473.
- [105] Thein-Han, W.W., Misra, R.D.K. 2009. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.*, 5 (2009): 1182–1197.
- [106] Baino, F., Novajra, G., Vitale-Brovarone, C. 2015. Bioceramics and scaffolds: A winning combination for tissue engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 3 (2015): 1–17.
- [107] Wu, T.J., Huang, H.H., Lan, C.W., Lin, C.H., Hsu, F.Y., Wang, Y.J. 2004. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. *Biomaterials*, 25 (2004): 651–658.

- [108] Dey, S., Pal, S. 2009. Evaluation of collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *IFMBE Springer Verlag*, 23 (2009): 1267–1270.
- [109] Gao, J., Zhu, J., Luo, J., Xiong, J. 2009. Investigation of microporous composite scaffolds fabricated by embedding sacrificial polyethylene glycol microspheres in nanofibrous membrane. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, 91 (2016): 20–29.
- [110] Dorozhkin, S.V. 2015. Calcium orthophosphate bioceramics. *Ceram. Int.*, 41 (2015): 13913–13966.
- [111] Samavedi, S., Whittington, A.R., Goldstein, A.S. 2013. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering : A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.*, 9 (2013): 8037–8045.
- [112] Cheung, H.Y., Lau, K.T., Lu, T.P., Hui, D. 2007. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Compos. Part B Eng.*, 38 (2007): 291–300.
- [113] Jayakumar, R., Chennazhi, K.P., Srinivasan, S., Nair, S. V., Furuike, T., Tamura, H. 2011. Chitin scaffolds in tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, 12 (2011): 1876–1887.
- [114] Campbell, J.J., Husmann, A., Hume, R.D., Watson, C.J., Cameron, R.E. 2017. Development of three-dimensional collagen scaffolds with controlled architecture for cell migration studies using breast cancer cell lines. *Biomaterials*, 114 (2017): 34–43.
- [115] Natarajan, V., Krithica, N., Madhan, B., Sehgal, P.K. 2013. Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 101 (2013): 560–567.
- [116] Cholas, R., Padmanabhan, S.K., Gervaso, F., Udayan, G., Sannino, A., Licciulli, A. 2016. Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix. *Mater. Sci. Eng. C*, 63 (2016): 499–505.
- [117] Wu, M., Wang, Q., Liu, X., Liu, H. 2013. Biomimetic synthesis and characterization of carbon nanofiber/ hydroxyapatite composite scaffolds. *Carbon*, 51 (2013): 335–345.
- [118] Nejati, E., Mirzadeh, H., Zandi, M. 2008. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite rods/poly(L-lactide acid) composite scaffolds for bone tissue engineering. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, 39 (2008): 1589–1596.
- [119] Islam, M.S., Todo, M. 2016. Effects of sintering temperature on the compressive mechanical properties of collagen/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Lett.*, 173 (2016): 231–234.

- [120] Kikuchi, M., Matsumoto, H.N., Yamada, T., Koyama, Y., Takakuda, K., Tanaka, J. 2004. Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites. *Biomaterials*, 25 (2004): 63–69.
- [121] Mele, L., Vitiello, P.P., Tirino, V., Paino, F., De Rosa, A., Liccardo, D., Papaccio, G., Desiderio, V. 2016. Changing paradigms in cranio-facial regeneration: Current and new strategies for the activation of endogenous stem cells. *Front. Physiol.*, 7 (2016): 1–13.
- [122] Mao, H., Kawazoe, N., Chen, G. 2015. Cell response to single-walled carbon nanotubes in hybrid porous collagen sponges. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 126 (2015): 63–69.
- [123] Park, J.E., Park, I., Neupane, M.P., Bae, T., Lee, M. 2014. Applied Surface Science Effects of a carbon nanotube-collagen coating on a titanium surface on osteoblast growth. *Appl. Surf. Sci.*, 292 (2014): 828–836.
- [124] Panda, N.N., Jonnalagadda, S., Pramanik, K. 2013. Development and evaluation of cross-linked collagen-hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 24 (2013): 2031–44.
- [125] Balani, K., Anderson, R., Laha, T., Andara, M., Tercero, J., Crumpler, E., Agarwal, A. 2007. Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro. *Biomaterials*, 28 (2007): 618–624.
- [126] Fernandes, L.L., Resende, C.X., Tavares, D.S., Soares, G. A., Castro, L.O., Granjeiro, J.M. 2011. Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering. *Polímeros*, 21 (2011): 1–6.
- [127] Vaezifar, S., Razavi, S., Golozar, M.A., Esfahani, H.Z., Morshed, M., Karbasi, S. 2015. Characterization of PLGA/Chitosan electrospun nano-biocomposite fabricated by two different methods. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, 64 (2015): 64–75.
- [128] Venkatesan, J., Qian, Z.J., Ryu, B., Ashok Kumar, N., Kim, S.K. 2011. Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan - Natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.*, 83 (2011): 569–577.
- [129] Jeon, S.J., Ma, Z., Kang, M., Galvão, K.N., Jeong, K.C. 2016. Application of chitosan microparticles for treatment of metritis and in vivo evaluation of broad spectrum antimicrobial activity in cow uteri. *Biomaterials*, 110 (2016): 71–80.

- [130] Zhang, B., Xing, Y., Li, Z., Zhou, H., Mu, Q., Yan, B., Shim, M., Moore, J., Campbell, P.N. 2002. Functionalisation of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition. *Biochem. Educ.*, 6 (2002): 285–288.
- [131] Chen, Y., Zhang, Y.Q., Zhang, T.H., Gan, C.H., Zheng, C.Y., Yu, G. 2006. Carbon nanotube reinforced hydroxyapatite composite coatings produced through laser surface alloying. *Carbon*, 44 (2006): 37–45.
- [132] Bandaru, P.R. 2007. Electrical properties and applications of carbon nanotube structures. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7 (2007): 1239–1267.
- [133] Li, X., Chen, W., Zhan, Q., Dai, L., Sowards, L., Pender, M., Naik, R.R. 2006. Direct measurements of interactions between polypeptides and carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. B.*, 110 (2006): 12621–12625.
- [134] Abarrategi, A., Gutiérrez, M.C., Moreno-Vicente, C., Hortigüela, M.J., Ramos, V., López-Lacomba, J.L., Ferrer, M.L., Del Monte, F. 2008. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials*, 29 (2008): 94–102.
- [135] Li, X., Liu, H., Niu, X., Yu, B., Fan, Y., Feng, Q., Zhai Cui, F., Watari, F. 2012. The use of carbon nanotubes to induce osteogenic differentiation of human adipose-derived MSCs in vitro and ectopic bone formation in vivo. *Biomaterials*, 33 (2012): 4818–4827.
- [136] Eatemadi, A., Daraee, H., Karimkhanloo, H., Kouhi, M., Zarghami, N. 2014. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Res. Lett*, 9 (2014): 1–13.
- [137] Warowicka, A., Maciejewska, B.M., Litowczenko, J. 2016. MWCNT based matrices as a platform for adhesion and growth of cells. *Compos. Sci. Technol.*, 136 (2016): 29–38.
- [138] Zhong, Z., Qin, J., Ma, J. 2015. Electrophoretic deposition of biomimetic zinc substituted hydroxyapatite coatings with chitosan and carbon nanotubes on titanium. *Ceram. Int.*, 41 (2015): 8878–8884.
- [139] Liu, S., Li, H., Su, Y., Guo, Q., Zhang, L. 2017. Preparation and properties of in-situ growth of carbon nanotubes reinforced hydroxyapatite coating for carbon/carbon composites. *Mater. Sci. Eng. C*, 70 (2017): 805–811.
- [140] Barabás, R., Katona, G., Bogy, E.S., Diudea, M. V., Szentes, A., Zsirka, B., Kovács, J., Kékedy-Nagy, L., Czikó, M. 2015. Preparation and characterization of carboxyl functionalized multiwall carbon nanotubes-hydroxyapatite composites. *Ceram. Int.*, 41 (2015): 12717–12727.

- [141] Baishya, P., Maji, T.K. 2016. Functionalization of MWCNT and their application in properties development of green wood nanocomposite. *Carbohydr. Polym.*, 149 (2016): 332–339.
- [142] Zhao, B., Hu, H., Mandal, S.K., Haddon, R.C. 2005. A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes. *Chem. Mater.*, (2005): 3235–3241.
- [143] Yoon, I., Hwang, J. 2014. Carbon nanotube-gelatin-hydroxyapatite nanohybrids with multilayer core – shell structure for mimicking natural bone. *Carbon*, 7911 (2014): 1–11.
- [144] Zhifu, F., Haihong, W., Zhikun, L., Baocheng, Y., Nielsen, P. 2017. A comparative study of graphene oxide affecting the nanoarchitecture and electrochemical properties of urchin-shape nickel cobalt oxide. *Vacuum*, 137 (2017): 125–136.
- [145] Zhang, X., Yin, J., Peng, C., Hu, W., Zhu, Z., Li, W., Fan, C., Huang, Q. 2017. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon*, 49 (2011): 986–995.
- [146] Chang, Y., Yang, S.T., Liu, J.H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., Liu, Y., Wang, H. 2011. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol. Lett.*, 200 (2011): 201–210.
- [147] Sun, X., Liu, Z., Welsher, K., Robinson, J.T., Goodwin, A., Zaric, S., Dai, H. 2008. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Res.*, 1 (2008): 203–212.
- [148] Rella, S., Giuri, A., Esposito, C., Rosaria, M., Colella, S., Guerra, G., Listorti, A., Rizzo, A., Malitesta, C. 2015. X-ray photoelectron spectroscopy of reduced graphene oxide prepared by a novel green method. *Vacuum*, 119 (2015): 159–162.
- [149] Allen, M.J., Tung, V.C., Kaner, R.B. 2010. Honeycomb carbon: A review of graphene. *Chem. Rev.*, 110 (2010): 132–145.
- [150] Mittal, G., Dhand, V., Rhee, K.Y., Park, S.J., Lee, W.R. 2015. A review on carbon nanotubes and graphene as fillers in reinforced polymer nanocomposites. *J. Ind. Eng. Chem.*, 21 (2015): 11–25.
- [151] Yang, B., Wang, S., Guo, Y., Yuan, J., Si, Y., Zhang, S., Chen, H. 2014. Strength and failure behavior of a graphene sheet containing bi-grain-boundaries. *RSC Adv.*, 4 (2014): 54677–54683.
- [152] Agarwal, S., Zhou, X., Ye, F., He, Q., Chen, G.C.K., Soo, J., Boey, F., Zhang, H., Chen, P. 2010. Interfacing live cells with nanocarbon substrates. *Langmuir*, 26 (2010): 2244–2247.

- [153] Fan, Z., Wang, J., Wang, Z., Ran, H., Li, Y., Niu, L., Gong, P., Liu, B., Yang, S. 2014. One-pot synthesis of graphene/hydroxyapatite nanorod composite for tissue engineering. *Carbon*, 66 (2014): 407–416.
- [154] Saffar, K.P., Arshi, A.R., Jamilpour, N., Najafi, A.R., Rouhi, G., Sudak, L. 2010. A cross-linking model for estimating Young's modulus of artificial bone tissue grown on carbon nanotube scaffold. *Wiley InterSci.*, 94 (2): 594–602.
- [155] Online, V.A. 2013. Synthesis of hydroxyapatite – reduced graphite oxide nanocomposites for biomedical applications : oriented nucleation and epitaxial growth of hydroxyapatite †. *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013): 1826–1834.
- [156] Pramatarova, L., E Pecheva., Petrov, T., Kondyurin, A., Pramatarova, R. 2004. Ion beam and laser processing for hydroxyapatite formation. *Vacuum*, 76 (2004): 339–342.
- [157] Huebsch, N., Mooney, D.J. 2009. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*, 462 (2009): 426–32.
- [158] Xia, F., Jiang, L. 2008. Bio-inspired, smart, multiscale interfacial materials. *Adv. Mater.*, 20 (2008): 2842–2858.
- [159] Xiao, Y., Gong, T., Zhou, S. 2010. The functionalization of multi-walled carbon nanotubes by in situ deposition of hydroxyapatite. *Biomaterials*, 31 (2010): 5182–5190.
- [160] Pramatarova, L., Pecheva, E., Dimova-malinovska, D., Pramatarova, R. 2004. Porous silicon as a substrate for hydroxyapatite growth. *Vacuum*, 76 (2004): 135–138.
- [161] Kyu, H.H., Abate, D., Abate, K.H., Al, E. 2018. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 392 (2018): 1859–1922.
- [162] Li, Y., Kumacheva, E. 2018. Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. *Sci. Adv.*, 4 (2018): 1–11.
- [163] Huang, P., Wang, X., Liang, X., Yang, J., Zhang, C., Kong, D., Wang, W. 2019. Nano-, micro-, and macroscale drug delivery systems for cancer immunotherapy. *Acta Biomater.*, 85 (2019): 1–26.
- [164] Niu, S., Williams, G.R., Wu, J., Wu, J., Zhang, X., Zheng, H., Li, S., Zhu, L.M. 2019. A novel chitosan-based nanomedicine for multi-drug resistant breast cancer therapy. *Chem. Eng. J.*, 369 (2019): 134–149.

- [165] Chen, K., Cai, H., Zhang, H., Zhu, H., Gu, Z., Gong, Q., Luo, K. 2019. Stimuli-responsive polymer-doxorubicin conjugate: Antitumor mechanism and potential as nano-prodrug. *Acta Biomater.*, 84 (2019): 339–355.
- [166] Wong, X.Y., Sena-Torralba, A., Alvarez-Diduk, R., Muthoosamy, K., Merkoçi, A. 2020. Nanomaterials for nanotheranostics: Tuning their properties according to disease needs. *ACS Nano*, 14 (3): 2585–2627.
- [167] Jia, Q., Li, Z., Guo, C., Huang, X., Kang, M., Song, Y., He, L., Zhou, N., Wang, M., Zhang, Z., Fu, G., Du, M. 2020. PEGMA-modified bimetallic NiCo Prussian blue analogue doped with Tb(III) ions: Efficiently pH-responsive and controlled release system for anticancer drug. *Chem. Eng. J.*, 389 (2020): 124468–124479.
- [168] Guan, G., Wu, M., Han, M.Y. 2020. Stimuli-responsive hybridized nanostructures. *Adv. Funct. Mater.*, 30 (2020): 1–27.
- [169] Chen, W.H., Luo, G.F., Zhang, X.Z. 2019. Recent advances in subcellular targeted cancer therapy based on functional materials. *Adv. Mater.*, 31 (2019): 1–39.
- [170] Blum, A.P., Kammeyer, J.K., Rush, A.M., Callmann, C.E., Hahn, M.E., Gianneschi, N.C. 2015. Stimuli-responsive nanomaterials for biomedical applications. *J. Am. Chem. Soc.*, 137 (2015): 2140–2154.
- [171] Hao, G., Xu, Z.P., Li, L. 2018. Manipulating extracellular tumour pH: An effective target for cancer therapy. *RSC Adv.*, 8 (2018): 22182–22192.
- [172] Santamaria, C.M., Woodruff, A., Yang, R., Kohane, D.S. 2017. Drug delivery systems for prolonged duration local anesthesia. *Mater. Today*, 20 (2017): 22–31.
- [173] Ma, Y., Shi, L., Liu, F., Zhang, Y., Pang, Y., Shen, X. 2019. Self-assembled thixotropic silver cluster hydrogel for anticancer drug release. *Chem. Eng. J.*, 362 (2019): 650–657.
- [174] Jia, Q., Zhao, Z., Liang, K., Nan, F., Li, Y., Wang, J., Ge, J., Wang, P. 2019. Recent advances and prospects of carbon dots in cancer nanotheranostics. *Mater. Chem. Front.*, 4 (2020): 449–471.
- [175] Su, W., Wu, H., Xu, H., Zhang, Y., Li, Y., Li, X., Fan, L. 2020. Carbon dots: a booming material for biomedical applications. *Mater. Chem. Front.*, 4 (2020): 821–836.
- [176] Hu, Y., Cao, S., Chen, J., Zhao, Y., He, F., Li, Q., Zou, L., Shi, C. 2020. Biomimetic fabrication of icariin loaded nano hydroxyapatite reinforced bioactive porous scaffolds for bone regeneration. *Chem. Eng. J.*, 394 (2020): 124895.

- [177] Xu, H., Lv, Y., Qiu, D., Zhou, Y., Zeng, H., Chu, Y. 2019. An ultra-stretchable, highly sensitive and biocompatible capacitive strain sensor from an ionic nanocomposite for on-skin monitoring. *Nanoscale*, 11 (2019): 1570–1578.
- [178] Habraken, W., Habibovic, P., Epple, M., Bohner, M. 2016. Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future? *Mater. Today*, 19 (2016): 69–87.
- [179] Kokubo, T., Takadama, H. 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27 (2006): 2907–2915.
- [180] Hummers, W.S., Offeman, R.E. 1958. Preparation of graphitic oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958): 1339–1339.
- [181] Allahyari, Z., Haghighipour, N., Moztarzadeh, F., Ghazizadeh, L., Hamrang, M., Shokrgozar, M.A., Gholizadeh, S. 2016. Optimization of electrical stimulation parameters for MG-63 cell proliferation on chitosan/functionalized multiwalled carbon nanotube films. *RSC Adv.*, 6 (2016): 109902–109915.
- [182] Jeon, S.J., Oh, M., Yeo, W., Galvão, K.N., Jeong, K.C. 2014. Underlying mechanism of antimicrobial activity of chitosan microparticles and implications for the treatment of infectious diseases. *Plos One*, March (2014): 1–12.
- [183] Ming-lun, L.L.Y.J. 2009. Microstructure and mechanical properties analysis of β -tricalcium phosphate/carbon nanotubes scaffold based on rapid prototyping. *J Shanghai Univ (Engl Ed)*, 13 (2009): 349–351.
- [184] Waheed, S., Sultan, M., Jamil, T., Hussain, T. 2015. Comparative analysis of hydroxyapatite synthesized by sol-gel, ultrasonication and microwave assisted technique. *Mater. Today Proc.*, 2 (2015): 5477–5484.
- [185] Bakan, F., Laçın, O., Sarac, H. 2013. A novel low temperature sol-gel synthesis process for thermally stable nano crystalline hydroxyapatite. *Powder Technol.*, 233 (2013): 295–302.
- [186] Liu, X., Liu, J., Zheng, B., Yan, L., Dai, J., Zhuang, Z., Du, J., Guo, Y., Xiao, D. 2017. N-Doped carbon dots: green and efficient synthesis on a large-scale and their application in fluorescent pH sensing. *New J. Chem.*, 41 (2017): 10607–10612.
- [187] Degirmenbasi, N., Kalyon, D.M., Birinci, E. 2006. Biocomposites of nanohydroxyapatite with collagen and poly(vinyl alcohol). *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 48 (2006): 42–49.
- [188] Fan, W., Sun, Z., Wang, J., Zhou, J., Wu, K., Cheng, Y. 2016. Evaluation of $\text{Sm}_{0.95}\text{Ba}_{0.05}\text{Fe}_{0.95}\text{Ru}_{0.05}\text{O}_3$ as a potential cathode material for solid oxide fuel cells. *RSC Adv.*, 6 (2016): 34564–34573.

- [189] Edax, T., Microanalysis course tasks. 7.3 (2009): 1–43.
- [190] Vijayalakshmi, U., Rajeswari, S. 2012. Influence of process parameters on the sol-gel synthesis of nano hydroxyapatite using various phosphorus precursors. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 63 (2012): 45–55.
- [191] Browne, S., Zeugolis, D.I., Pandit, A. 2013. Collagen: Finding a solution for the source. *Tissue Eng. Part A.*, 19 (2013): 1491–1494.
- [192] Wahl, D.A., Sachlos, E., Liu, C., Czernuszka, J.T. 2007. Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 18 (2007): 201–209.
- [193] Haugh, M.G., Jaasma, M.J., O'Brien, F.J. 2009. The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen- GAG scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 89 (2009): 363–369.
- [194] Lin, G.G., Scott, J.G. 2013. The Effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ecm on the chondrogenic differentiation of MSCs. *Biomaterials*, 34 (2013): 5802–5812.
- [195] Wahl, D.A., Czernuszka, J.T. 2006. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur. Cells Mater.*, 11 (2006): 43–56.
- [196] Suwandi, J.S., Toes, R.E.M., Nikolic, T., Roep, B.O. 2015. Inducing tissue specific tolerance in autoimmune disease with tolerogenic dendritic cells. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 33 (2015): 97–103.
- [197] Fu, Q., Zhang, F., Qi, N., Wang, Z., Chen, Y., Liu, Y. 2016. In vitro proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in injectable thermo-sensitive chitosan/ β -glycerophosphate/hydroxyapatite hydrogel. *J. Biomater. Appl.*, 31 (2016): 317–327.
- [198] Lin, K., Xia, L., Gan, J., Zhang, Z., Chen, H., Jiang, X., Chang, J. 2013. Tailoring the nanostructured surfaces of hydroxyapatite bioceramics to promote protein adsorption, osteoblast growth, and osteogenic differentiation. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 5 (2013): 8008–8017.
- [199] Zhuang, Z., Fujimi, T.J., Nakamura, M., Konishi, T., Yoshimura, H., Aizawa, M. 2013. Development of a,b-plane-oriented hydroxyapatite ceramics as models for living bones and their cell adhesion behavior. *Acta Biomater.*, 9 (2013): 6732–6740.
- [200] Xu, Z., Liu, C., Wei, J., Sun, J. 2012. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts. *J. Appl. Toxicol.*, 32 (2012). 429–435.

- [201] Xia, L., Lin, K., Jiang, X., Xu, Y., Zhang, M., Chang, J., Zhang, Z. 2013. Enhanced osteogenesis through nano-structured surface design of macroporous hydroxyapatite bioceramic scaffolds via activation of ERK and p38 MAPK signaling pathways. *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013): 5363–5522.
- [202] Lin, K., Wu, C., Chang, J. 2014. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. *Acta Biomater.*, 10 (2014): 4071–4102.
- [203] Xu, J.L., Khor, K.A., Sui, J.J., Zhang, J.H., Chen, W.N. 2009. Protein expression profiles in osteoblasts in response to differentially shaped hydroxyapatite nanoparticles. *Biomaterials*, 30 (2009): 5385–5391.
- [204] Shi, Z., Huang, X., Cai, Y., Tang, R., Yang, D. 2009. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. *Acta Biomater.*, 5 (2009): 338–345.
- [205] Monika, Š. 2015. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications : A review. *Ceram. Int.*, 41 (2015): 9203–9231.
- [206] Kannan, S., Rocha, J.H.G., Ferreira, J.M.F. 2006. Synthesis of hydroxy-chlorapatites solid solutions. *Mater. Lett.*, 60 (2006): 864–868.
- [207] Sanosh, K.P., Chu, M.C., Balakrishnan, A., Lee, Y.J., Kim, T.N., Cho, S.J. 2009. Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. *Curr. Appl. Phys.*, 9 (2009): 1459–1462.
- [208] Currey, J. 2001. Sacrificial bonds heal bone. *Nature*, 414 (2001): 699.
- [209] Ming Zhao, Q., Lin Yang, H., Tang Liu, Z., Feng Gu, X., Li, C., Hong Feng, D. 2015. Fabrication of hydroxyapatite on pure titanium by micro-arc oxidation coupled with microwave-hydrothermal treatment. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 26 (2015): 88–95.
- [210] Lukić, M., Stojanović, Z., Škapin, S.D., Maček-Kržmanc, M., Mitrić, M., Marković, S., Uskoković, D. 2011. Dense fine-grained biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics designed by two-step sintering. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 31 (2011): 19–27.
- [211] Siddharthan, A., Seshadri, S.K., Sampath Kumar, T.S. 2004. Microwave accelerated synthesis of nanosized calcium deficient hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 15 (2004): 1279–1284.
- [212] Kim, J.H., Kim, S.H., Kim, H.K., Akaike, T., Kim, S.C. 2002. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *J. Biomed. Mater. Res.*, 62 (2002): 600–612.

- [213] Paz, A., Guadarrama, D., López, M., González, J.E., Brizuela, N., Aragón, J. 2012. A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes. *Quim. Nov.*, 35 (9): 1724–1727.
- [214] Varma, H.K., Babu, S.S. 2005. Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method. *Ceram. Int.*, 31 (2005): 109–114.
- [215] Mujahid, M., Sarfraz, S., Amin, S., Road, J. 2015. On the formation of hydroxyapatite nano crystals prepared using cationic surfactant. *Mater. Res.*, 18 (2015): 468–472.
- [216] Fan, Z.J., Kai, W., Yan, J., Wei, T., Zhi, L.J., Feng, J., Ren, Y.M., Song, L.P., Wei, F. 2011. Facile synthesis of graphene nanosheets via Fe reduction of exfoliated graphite oxide. *ACS Nano*, 5 (2011): 191–198.
- [217] Yang, Z., Zheng, Q., Qiu, H., Li, J., Yang, J. 2015. A simple method for the reduction of graphene oxide by sodium borohydride with CaCl_2 as a catalyst. *New Carbon Mater.*, 30 (2015): 41–47.
- [218] Chen, J., Yao, B., Li, C., Shi, G. 2013. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. *Carbon*, 64 (2013). 225–229.
- [219] Najafi, H., Nemati, Z.A., Sadeghian, Z. 2009. Inclusion of carbon nanotubes in a hydroxyapatite sol-gel matrix. *Ceram. Int.*, 35 (2009): 2987–2991.
- [220] Stankovich, S., Dikin, D.A., Piner, R.D., Kohlhaas, K.A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S.B.T., Ruoff, R.S. 2007. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon*, 45 (2007): 1558–1565.
- [221] Gilje, S., Kaner, R.B., Wallace, Li, G.G., D.A.N., Mu, M.B., Muller, M.B., Gilje, S., Kaner, R.B., Wallace, G.G. 2008. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nat. Nanotechnol.*, 3 (2008): 101–105.
- [222] Feng, M., Feng, H. 2013. Effect of reducing agent on the chemical reduction of graphene oxides. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 13 (2013): 937–941.
- [223] Li, M., Wang, Y., Liu, Q., Li, Q., Cheng, Y., Zheng, Y., Xi, T., Wei, S. 2013. In situ synthesis and biocompatibility of nano hydroxyapatite on pristine and chitosan functionalized graphene oxide. *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013): 475–484.
- [224] Song, P., Zhang, X., Sun, M., Cui, X., Lin, Y. 2012. Synthesis of graphene nanosheets via oxalic acid-induced chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *RSC Adv.*, 2 (2012): 1168–1173.
- [225] Yang, S., Yue, W., Huang, D., Chen, C., Lin, H., Yang, X. 2012. A facile green strategy for rapid reduction of graphene oxide by metallic zinc. *RSC Adv.*, 2 (2012): 8827–8832.

- [226] Chen, S., Ding, R., Ma, X., Xue, L., Lin, X., Fan, X., Luo, Z. 2016. Preparation of highly dispersed reduced graphene oxide modified with carboxymethyl chitosan for highly sensitive detection of trace Cu(II) in water. *Polymers*, 8 (78): 1–11
- [227] Samanta, S., Singh, S., Sahoo, R.R. 2015. Simultaneous chemical reduction and surface functionalization of graphene oxide for efficient lubrication of steel-steel contact. *RSC Adv.*, 5 (2015): 61888–61899.
- [228] Baradaran, S., Moghaddam, E., Basirun, W.J., Mehrali, M., Sookhakian, M., Hamdi, M., Moghaddam, M.R.N., Alias, Y. 2013. Mechanical properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite. *Carbon*, 69 (2013): 32–45.
- [229] Jana, M., Saha, S., Khanra, P., Murmu, N.C., Srivastava, S.K., T. Kuila, Lee, J.H. 2014. Bio-reduction of graphene oxide using drained water from soaked mung beans (*Phaseolus aureus* L.) and its application as energy storage electrode material. *Mater. Sci. Eng. B*, 186 (2014): 33–40.
- [230] Nethravathi, C., Rajamathi, M. 2008. Chemically modified graphene sheets produced by the solvothermal reduction of colloidal dispersions of graphite oxide. *Carbon*, 46 (2008): 1994–1998.
- [231] Wang, X., Song, L., Yang, H., Xing, W., Kandola, B., Hu, Y. 2012. Simultaneous reduction and surface functionalization of graphene oxide with POSS for reducing fire hazards in epoxy composites. *J. Mater. Chem.*, 22 (2012): 22037–22043.
- [232] Das, A.K., Srivastav, M., Layek, R.K., Uddin, M.E., Jung, D., Kim, N.H., Lee, J.H. 2014. Iodide-mediated room temperature reduction of graphene oxide: a rapid chemical route for the synthesis of a bifunctional electrocatalyst. *J. Mater. Chem. A*, 2 (2014): 1332–1340.
- [233] Wang, G., Yang, Z., Li, X., Li, C. 2005. Synthesis of poly (aniline-co-o-anisidine) - intercalated graphite oxide composite by delamination / reassembling method. *Carbon*, 43 (2005): 2564–2570.
- [234] Vu, T.H.T., Tran, T.T.T., Le, H.N.T., Nguyen, P.H.T., Bui, N.Q., Essayem, N. 2015. A new green approach for the reduction of graphene oxide nanosheets using caffeine. *Bull. Mater. Sci.*, 38 (2015): 667–671.
- [235] Zanin, H., Saito, E., Marciano, F.R., Ceragioli, H.J., Campos Granato, A.E., Porcionatto, M., Lobo, A.O. 2013. Fast preparation of nano-hydroxyapatite/superhydrophilic reduced graphene oxide composites for bioactive applications. *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013): 4947.
- [236] Zhang, Q., Liu, Y., Zhang, Y., Li, H., Tan, Y., Luo, L., Duan, J., Li, K., Banks, C.E. 2015. Facile and controllable synthesis of hydroxyapatite/graphene hybrid

- materials with enhanced sensing performance towards ammonia. *Analyst*, 140 (2015): 5235–5242.
- [237] Liu, D.M., Troczynski, T., Tseng, W.J. 2001. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: Process development. *Biomaterials*, 22 (2001): 1721–1730.
- [238] Uchida, M., Kim, H.M., Kokubo, T., Fujibayashi, S., Nakamura, T. 2002. Effect of water treatment on the apatite-forming ability of NaOH-treated titanium metal. *J. Biomed. Mater. Res.*, 63 (2002): 522–530.
- [239] Cui, L.Y., Zeng, R.C., Zhu, X.X., Pang, T.T., Li, S.Q., Zhang, F. 2016. Corrosion resistance of biodegradable polymeric layer-by-layer coatings on magnesium alloy AZ31. *Front. Mater. Sci.*, 10 (2016): 134–146.
- [240] Harris, J., Mey, I., Hajir, M., Mondeshki, M., Wolf, S.E. 2015. Pseudomorphic transformation of amorphous calcium carbonate films follows spherulitic growth mechanisms and can give rise to crystal lattice tilting. *Cryst. Eng. Comm.*, 17 (2015): 6831–6837.
- [241] Murakami, F.S., Rodrigues, P.O. 2007. Physicochemical study of CaCO₃ from egg shells. *Cienc. Technol. Aliment. Campinas*, 27 (2007): 658–662.
- [242] Lau, C., Cooney, M.J. 2008. Conductive macroporous composite chitosan - carbon nanotube scaffolds. *Langmuir*, 24 (2008): 7004–7010.
- [243] Maksimkin, A. V., Kaloshkin, S.D., Kaloshkina, M.S., Gorshenkov, M. V., Tcherdyntsev, V. V., Ergin, K.S., Shchetinin, I. V. 2012. Ultra-high molecular weight polyethylene reinforced with multi-walled carbon nanotubes: Fabrication method and properties. *J. Alloys Compd.*, 536 (2012): S538–S540.
- [244] Vellaichamy, B., Periakaruppan, P., Arumugam, R., Sellamuthu, K., Nagulan, B. 2018. A novel photocatalytically active mesoporous metal-free PPy grafted MWCNT nanocomposite, *J. Colloid Interface Sci.* 514 (2018): 376–385.
- [245] Zheng, X., Hui, J., Li, H., Zhu, C., Hua, X. 2017. Fabrication of novel biodegradable porous bone scaffolds based on amphiphilic hydroxyapatite nanorods. *Mater. Sci. Eng. C*, 75 (2017): 699–705.
- [246] Meskinfam, M., Bertoldi, S., Albanese, N., Cerri, A., Tanzi, M.C., Imani, R., Baheiraei, N. 2018. Polyurethane foam / nano hydroxyapatite composite as a suitable scaffold for bone tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng. C*, 82 (2018): 130–140.
- [247] Kaynak Bayrak, G., Demirtaş, T.T., Gümüşderelioğlu, M. 2017. Microwave-induced biomimetic approach for hydroxyapatite coatings of chitosan scaffolds. *Carbohydr. Polym.*, 157 (2017): 803–813.

- [248] Gleeson, J.P., Plunkett, N.A., O'Brien, F.J. 2010. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *Eur. Cells Mater.*, 20 (2010): 218–230.
- [249] Kang, Z., Zhang, X., Chen, Y., Akram, M.Y., Nie, J., Zhu, X. 2017. Preparation of polymer / calcium phosphate porous composite as bone tissue scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C*, 70 (2017): 1125–1131.
- [250] Peter, M., Ganesh, N., Selvamurugan, N., Nair, S. V., Furuike, T., Tamura, H., Jayakumar, R. 2010. Preparation and characterization of novel β -chitin/nanodiopside/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.*, 80 (2010): 687–694.
- [251] Chandanshive, B.B., Rai, P., Rossi, A.L., Ersen, O., Khushalani, D. 2013. Synthesis of hydroxyapatite nanotubes for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C*, 33 (2013): 2981–2986.
- [252] Cho, Y., Ben, R. 2013. Electrically controlled release of the nerve growth factor from a collagen–carbon nanotube composite for supporting neuronal growth. *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013): 4166–4170.
- [253] Venkatesan, J., Qian, Z., Ryu, B. 2011. Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan – Natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.*, 83 (2011): 569–577.
- [254] Zhu, J., Wong, H.M., Yeung, K.W.K., Tjong, S.C. 2011. Spark plasma sintered hydroxyapatite/graphite nanosheet and hydroxyapatite/multiwalled carbon nanotube composites: Mechanical and in vitro cellular properties. *Adv. Eng. Mater.*, 13 (2011): 336–341.
- [255] Mendes, M.W.D., Greda, C.G., Bressiani, A.H.A., Bressiani, J.C. 2016. A new titanium based alloy Ti-27Nb-13Zr produced by powder metallurgy with biomimetic coating for use as a biomaterial. *Mater. Sci. Eng. C*, 63 (2016): 671–677.
- [256] Lee, Y.J., Park, S.J., Lee, W.K., Ko, J.S., Kim, H.M. 2003. MG63 osteoblastic cell adhesion to the hydrophobic surface precoated with recombinant osteopontin fragments. *Biomaterials*, 24 (2003): 1059–1066.
- [257] Lu, X., Å, Y.L. 2005. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials*, 26 (2005): 1097–1108.
- [258] Lagno, F., Rocha, S.D.F., Katsarou, L., Demopoulos, G.P. 2012. Supersaturation-controlled synthesis of dicalcium phosphate dihydrate and nanocrystalline calcium-deficient hydroxyapatite. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 51 (2012): 6605–6612.

- [259] Seyedraoufi, Z.S., Mirdamadi, S. 2014. Effects of pulse electrodeposition parameters and alkali treatment on the properties of nano hydroxyapatite coating on porous Mg-Zn scaffold for bone tissue engineering application. *Mater. Chem. Phys.*, 148 (2014): 1–9.
- [260] Bakhsheshi-Rad, H.R., Idris, M.H., Abdul-Kadir, M.R. 2013. Synthesis and in vitro degradation evaluation of the nano-HA/MgF₂ and DCPD/MgF₂ composite coating on biodegradable Mg-Ca-Zn alloy. *Surf. Coatings Technol.*, 222 (2013): 79–89.
- [261] Park, J.H., Lee, D.Y., Oh, K.T., Lee, Y.K., Kim, K.M., Kim, K.N. 2006. Bioactivity of calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid. *Mater. Lett.*, 60 (2006): 2573–2577.
- [262] Mirković, M.M., Pašti, T.D.L., Došen, A.M., Čebela, M.Ž., Rosić, A.A., Matović, B.Z., Babić, B.M. 2016. Adsorption of malathion on mesoporous monetite obtained by mechanochemical treatment of brushite. *RSC Adv.*, 6 (2016): 12219–12225.
- [263] Liu, B., Yuan Guo, Y., Yong Xiao, G., Peng Lu, Y. 2017. Preparation of micro/nano-fibrous brushite coating on titanium via chemical conversion for biomedical applications. *Appl. Surf. Sci.*, 399 (2017). 367–374.
- [264] Lee, D., Kumta, P.N. 2010. Chemical synthesis and stabilization of magnesium substituted brushite. *Mater. Sci. Eng. C*, 30 (2010): 934–943.
- [265] Lim, H.N., Kassim, A., Huang, N.M., Hashim, R., Radiman, S., Khiew, P.S., Chiu, W.S. 2009. Fabrication and characterization of 1D brushite nanomaterials via sucrose ester reverse microemulsion. *Ceram. Int.*, 35 (2009): 2891–2897.
- [266] Suryawanshi, V.B., Chaudhari, R.T. 2014. Growth and characterization of agar gel grown brushite crystals. *Indian J. Mater. Sci.*, 2014 (2014): 6.
- [267] Combes, C. 1998. XPS and IR study of calcium phosphate nucleation on titanium surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 11 (1998): 15–27.
- [268] Mobasherpour, I., Heshajin, M.S., Kazemzadeh, A., Zakeri, M. 2007. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method. *J. Alloys Compd.*, 430 (2007): 330–333.
- [269] Pang, Y.X., Bao, X. 2007. Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 23 (2003): 1697–1704.
- [270] Chen, L., Yin, C., Ku, H.S., Pong, C., Chen, X. 2014. Microwave sintering and characterization of polypropylene / multi-walled carbon nanotube / hydroxyapatite composites. *Compos. Part B*, 56 (2014): 504–511.

- [271] Prodana, M., Duta, M., Ionita, D., Bojin, D., Stan, M.S., Dinischiotu, A., Demetrescu, I. 2015. A new complex ceramic coating with carbon nanotubes, hydroxyapatite and TiO₂ nanotubes on Ti surface for biomedical applications. *Ceram. Int.*, 41 (2015): 6318–6325.
- [272] Narayanan, R., Seshadri, S.K., Kwon, T.Y., Kim, K.H. 2008. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, 85 (2008): 279–299.
- [273] Kim, H., Mondal, S., Bharathiraja, S., Manivasagan, P. 2018. Optimized Zn-doped hydroxyapatite / doxorubicin bioceramics system for efficient drug delivery and tissue engineering application. *Ceram. Int.*, 44 (2018): 6062–6071.
- [274] Zhao, C., Wang, X., Wu, L., Wu, W., Zheng, Y., Lin, L. 2019. Nitrogen-doped carbon quantum dots as an antimicrobial agent against *Staphylococcus* for the treatment of infected wounds. *Colloids Surfaces and B Biointerfaces*, 179 (2019): 17–27.
- [275] Riaz, R., Ali, M., Maiyalagan, T., Sameen, A., Lee, S., Jae, M. 2019. Dye-sensitized solar cell (DSSC) coated with energy down shift layer of nitrogen-doped carbon quantum dots (N-CQDs) for enhanced current density and stability applied surface science dye-sensitized solar cell (DSSC) coated with energy down shift lay. *Appl. Surf. Sci.*, 483 (2019): 425–431.
- [276] Lu, X., Liu, C., Wang, Z., Yang, J., Xu, M., Dong, J., Wang, P. 2018. Nitrogen-doped carbon nanoparticles derived from silkworm excrement as on – off – on fluorescent sensors to detect Fe (III) and biothiols. *Nanomaterials*, 8 (2018): 1–12.
- [277] Fan, M., Ma, Y., Tan, H., Jia, Y., Zou, S., Guo, S., Zhao, M., Huang, H., Ling, Z., Chen, Y., Hu, X. 2017. Covalent and injectable chitosan-chondroitin sulfate hydrogels embedded with chitosan microspheres for drug delivery and tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C*, 71 (2017): 67–74.
- [278] Tan, J., Zou, R., Zhang, J., Li, W., Zhang, L., Yue, D. 2016. Large-scale synthesis of N-doped carbon quantum dots and their phosphorescence properties in a polyurethane matrix. *Nanoscale*, 8 (2016): 4742–4747.
- [279] Wang, Z., Cao, L., Ding, Y., Shi, R., Wang, X., Lu, H., Liu, Z., Xiu, F., Liu, J., Huang, W. 2017. One-step and green synthesis of nitrogen-doped carbon quantum dots for multifunctional electronics. *RSC Adv.*, 7 (2017): 21969–21973.

- [280] Manatunga, D.C., De Silva, R.M., De Silva, K.M.N., Wijeratne, D.T., Malavige, G.N., Williams, G. 2018. Fabrication of 6-gingerol, doxorubicin and alginate hydroxyapatite into a bio-compatible formulation: enhanced anti-proliferative effect on breast and liver cancer cells. *Chem. Cent. J.*, 12 (2018): 1–13.
- [281] Anwar, A., Kanwal, Q., Akbar, S., Munawar, A., Durrani, A., Farooq, M.H. 2017. Synthesis and characterization of pure and nanosized hydroxyapatite bioceramics. *Nanotechnol Rev.*, 6 (2017): 149–157.
- [282] Negrila, C.C., Predoi, M.V., Iconaru, S.L., Predoi, D. 2018. Development of Zinc-doped hydroxyapatite by sol-gel method for medical applications. *Molecules*, 23 (2018): 1–15.
- [283] Khajuria, D.K., Kumar, V.B., Gigi, D., Gedanken, A., Karasik, D. 2018. Accelerated bone regeneration by nitrogen-doped carbon dots functionalized with hydroxyapatite nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10 (2018): 19373–19385.
- [284] Jijie, R., Barras, A., Bouckaert, J., Dumitrascu, N., Szunerits, S. 2018. Enhanced antibacterial activity of carbon dots functionalized with ampicillin combined with visible light triggered photodynamic effects. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 170 (2018): 347–354.
- [285] Tang, Y., Lu, G., Wu, J., Liu, Y., Wang, S., Sun, J., Teng, Z., Tian, Y. 2019. Gadolinium-doped hydroxyapatite nanorods as T1 contrast agents and drug carriers for breast cancer therapy. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2 (2019): 1194–1201.
- [286] Zhai, Y., Zhou, X., Zhang, Z., Zhang, L., Wang, D. 2018. Design, synthesis, and characterization of schiff base bond-linked pH-responsive Doxorubicin prodrug based on functionalized mPEG-PCL for targeted cancer therapy. *Polymers*, 10 (2018): 1–12.
- [287] Pandey, B., Verma, G., Hassan, P., Shetake, N.G., Barick, K.C., Kavirayani, I.P. 2018. Covalent immobilization of doxorubicin in glycine functionalized hydroxyapatite nanoparticles for pH-responsive release. *New J. Chem.*, 42 (2018): 6283–6292.
- [288] Chen, L., Xue, Y., Xia, X., Song, M., Huang, J., Zhang, H. 2015. A redox stimuli-responsive superparamagnetic nanogel with chemically anchored DOX for enhanced anticancer efficacy and low systemic adverse effect. *J. Mater. Chem. B*, 3 (2015): 8949–8962.
- [289] Rubini, K., John, S.A. 2017. Fabrication of nitrogen-doped carbon dots for screening the purine metabolic disorder in human fluids. *Biosens. and Bioelectron.*, 94 (2017): 30–38.

- [290] Li, T., Song, X., Weng, C., Wang, X., Sun, L., Gong, X., Yang, L., Chen, C. 2018. Self-crosslinking and injectable chondroitin sulfate / pullulan hydrogel for cartilage tissue engineering. *Appl. Mater. Today*, 10 (2018): 173–183.
- [291] Rizzo, C., Arcudi, F., Luka, Đ., Dintcheva, N.T., Noto, R., Anna, F.D., Prato, M. 2018. Nitrogen-doped carbon nanodots-ionogels: preparation, characterization, and radical scavenging activity. *ACS Nano*, 12 (2018): 1296–1305.
- [292] Ren, B., Chen, X., Du, S., Ma, Y., Chen, H., Yuan, G., Li, J., Xiong, D., Tan, H., Ling, Z., Chen, Y., Hu, X., Niu, X. 2018. Injectable polysaccharide hydrogel embedded with hydroxyapatite and calcium carbonate for drug delivery and bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 118 (2018): 1257–1266.
- [293] Wang, L., Deng, F., Wang, W., Li, A., Lu, C., Chen, H., Wu, G., Nan, K., Li, L. 2018. Construction of injectable self-healing macroporous hydrogels via a template-free method for tissue engineering and drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10 (2018): 36721–36732.
- [294] Lan, C., Zhao, S. 2018. Self-assembled nanomaterials for synergistic antitumour therapy. *J. Mater. Chem. B*, 6 (2018): 6685–6704.
- [295] Morsi, N.M., Nabil Shamma, R., Osama Eladawy, N., Abdelkhalek, A.A. 2019. Bioactive injectable triple acting thermosensitive hydrogel enriched with nano-hydroxyapatite for bone regeneration: in-vitro characterization, Saos-2 cell line cell viability and osteogenic markers evaluation. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 45 (2019): 787–804.
- [296] Yan, S., Ren, J., Jian, Y., Wang, W., Yun, W., Yin, J. 2018. Injectable maltodextrin based micelle/ hydrogel composites for simvastatin controlled release. *Biomacromolecules*, 19 (2018): 4554–4564.
- [297] Parks, H.C.W., Mccoy, T.M., Tabor, R.F. 2019. Carbon quantum dot assisted adsorption of graphene oxide to the oil – water interface for copper sensing emulsions. *Adv. Mater. Interfaces*, 6 (2019): 1–10.
- [298] Marques, S.E.F., Nieder, J.B. 2019. Surface charge tunable cationic vesicles based on serine-derived surfactants as efficient nanocarriers for the delivery of the anticancer drug doxorubicin†. *Nanoscale*, 11 (2019): 5932–5941.
- [299] Song, N., Wang, A. 2018. Study on influencing factors of Pickering emulsions stabilized by hydroxyapatite nanoparticles with nonionic surfactants. *Soft Matter*, 14 (2018): 3889–3901.
- [300] Charlotte, M., Laurichesse, E., Perro, A., Ravaine, V., Schmitt, V. 2019. Kinetics of spontaneous microgels adsorption and stabilization of emulsions produced using microfluidics. *J. Colloid Interface Sci.*, 548 (2019): 1–11.

- [301] Gupta, A., Mumtaz, S., Li, C.H., Hussain, I., Rotello, V.M. 2019. Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.*, 48 (2019): 415–427.
- [302] Caplin, J.D., García, A.J., 2019. Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models. *Acta Biomater.*, 93 (2019): 2–11.
- [303] Shen, T., Yang, W., Shen, X., Chen, W., Tao, B., Yang, X., Yuan, J., Liu, P., Cai, K. 2018. Polydopamine-assisted hydroxyapatite and lactoferrin multilayer on titanium for regulating bone balance and enhancing antibacterial property. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4 (2018): 3211–3223.
- [304] De, S., Patra, K., Ghosh, D., Dutta, K., Dey, A., Sarkar, G., Maiti, J., Basu, A., Rana, D., Chattopadhyay, D. 2018. Tailoring the efficacy of multifunctional biopolymeric graphene oxide quantum dot-based nanomaterial as nanocargo in cancer therapeutic application. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4 (2018): 514–531.
- [305] Munir, M.U., Ihsan, A., Sarwar, Y., Bajwa, S.Z., Bano, K., Tehseen, B., Zeb, N., Hussain, I., Ansari, M.T., Saeed, M., Li, J., Iqbal, M.Z., Wu, A., Khan, W.S. 2018. Hollow mesoporous hydroxyapatite nanostructures; smart nanocarriers with high drug loading and controlled releasing features. *Int. J. Pharm.*, 544 (2018): 112–120.
- [306] Agrawal, S., Kelkar, M., De, A. 2018. Newly emerging mesoporous strontium hydroxyapatite nanorods : microwave synthesis and relevance as doxorubicin nanocarrier. *J. Nanopart Res.*, 20 (2018): 1–11.
- [307] Srivastava, A., Liu, C., Lv, J., Qiao, W. 2018. Enhanced intercellular release of anticancer drug by using nano-sized cationic vesicles of doxorubicin hydrochloride and gemini surfactants. *J. Mol. Liq.*, 259 (2018): 398–410.
- [308] Sun, W., Fan, J., Wang, S., Kang, Y., Du, J., Peng, X. 2018. Biodegradable drug-loaded hydroxyapatite nanotherapeutic agent for targeted drug release in tumors. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10 (2018): 7832–7840.
- [309] Singh, V., Kashyap, S., Yadav, U., Srivastava, A., Singh, A.V., Singh, R.K., Singh, S.K., Saxena, P.S. 2019. Nitrogen doped carbon quantum dots demonstrate no toxicity under in vitro conditions in a cervical cell line and in vivo in Swiss albino mice. *Toxicol. Res.*, 8 (2019): 395–406.
- [310] Lim, S.Y., Shen, W., Gao, Z. 2015. Carbon quantum dots and their applications. *Chem. Soc. Rev.*, 44 (2015): 362–381.
- [311] Pal, T., Mohiyuddin, S., Packirisamy, G. 2018. Facile and green synthesis of multicolor fluorescence carbon dots from curcumin: in vitro and in vivo bioimaging and other applications. *ACS Omega*, 3 (2018): 831–843.

- [312] Yang, X., Raucci, M.G., Zhu, X., Santin, M., Ambrosio, L., Yuan, B., Fan, Y., Zhang, X. 2018. Injectable strontium-doped hydroxyapatite integrated with phosphoserine-tethered poly(epsilon-lysine) dendrons for osteoporotic bone defect repair. *J. Mater. Chem. B*, 6 (2018): 7974–7984.
- [313] Michael, F.M., Khalid, M., Ratnam, C.T., Chee, C.Y., Rashmi, W., Hoque, M.E. 2015. Sono-synthesis of nanohydroxyapatite: Effects of process parameters. *Ceram. Int.*, 42 (2015): 6263–6272.
- [314] Oosterbos, C.J.M., Ch Vogely, H., Nijhof, M.W., Flier, A., Verbout, A.J., Tonino, A.J., Dhert, W.J.A. 2002. Osseointegration of hydroxyapatite-coated and noncoated Ti6Al4V implants in the presence of local infection: A comparative histomorphometrical study in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.*, 60 (2002): 339–347.
- [315] Zhang, F., Cai, S., Xu, G., Wang, F., Yu, N., Ling, R., Wu, X. 2016. Preparation and bioactivity of apatite coating on Ti6Al4V alloy by microwave assisted aqueous chemical method. *Ceram. Int.*, 42 (16): 18466–18473.
- [316] Wei, J., Chen, Q.Z., Stevens, M.M., Roether, J.A., Boccaccini, A.R. 2008. Biocompatibility and bioactivity of PDLLA/TiO₂ and PDLLA/TiO₂/Bioglass nanocomposites. *Mater. Sci. Eng. C*, 28 (2008): 1–10.
- [317] Gholizadeh, S., Moztarzadeh, F., Haghighipour, N., Ghazizadeh, L., Baghbani, F., Shokrgozar, M.A., Allahyari, Z. 2017. Preparation and characterization of novel functionalized multiwalled carbon nanotubes/chitosan/ β -Glycerophosphate scaffolds for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 97 (2017): 365–372.

ÖZGEÇMİŞ

Serbülent TÜRK, 19.07.1990'da Edirne'de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Edirne'de tamamladı. 2008 yılında Edirne İlhami Ertem (Y.D.A) Lisesinden mezun oldu. Aynı yıl başladığı Trakya Üniversitesi Kimya Bölümünü 2012 yılında, 2010 yılında başladığı Trakya Üniversitesi Matematik Bölümünü (Ç.A.P.) ise 2013 yılında bitirdi. Trakya Üniversitesi Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimini 2013-2015 yılları arasında tamamladı. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Kimya Bölümünde doktora eğitimine başladı. Aynı yıl Sakarya Üniversitesi BİMAYAM'da Uzman olarak çalışmaya başladı ve akabinde doktora eğitimine Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümünde devam etti. Halen Sakarya Üniversitesi BİMAYAM'da Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktadır.