

Sığır Kemiğinden Sentezlenen Hidroksiapatit ile Hidroksiapatit–Nişasta Biyokompozit Fiberlerin Üretim ve Karakterizasyonu

Gülsüm AYDIN¹, Mehmet Okan ERDAL²

¹Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Konya.

²Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Meslek Yüksekokulu, Konya.

gkalemtas@gmail.com ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3868-8563>

moerdal@erbakan.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4469-3438>

Geliş Tarihi: 08.09.2019; Kabul Tarihi: 15.09.2019

Öz

Yapılan bu çalışmada elektro çekim yöntemiyle hidroksiapatit-nişasta biyokompozit fiberler üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Nişasta yeryüzünde en fazla bulunan doğal biyopolimerdir ve biyouyumluluk, biyobozunurluk ve biyoabsorplanabilirlik özellikleri nedeniyle medikal uygulamalarda tercih edilmektedir. Kemiğin temel inorganik bileşeni olan hidroksiapatit (HA) ise kemik doku onarım uygulamaları için polimerlerle birlikte kompozit doku iskeleleri hazırlanmasında yaygın olarak tercih edilen bir biyoseramiktir. Bu çalışmada elde edilen biyokompozitlerin üretiminde kullanılan HA seramiği sığır kemiklerinin 950 °C'de 3 saat süreyle kalsinasyonu ile sentezlenmiştir. XRD analizleri sentezlenen tozların yapısında HA dışında herhangi bir fazın bulunmadığını, SEM incelemeleri ise tozların oldukça homojen tane boyut ve dağılımına sahip olduğunu göstermiştir. Kütlece % 7,5 oranında nişasta kullanılarak, 10 kV elektriksel alan şiddeti ve 4 ml/sa şırınga besleme hızı ile gerçekleştirilen elektro çekim işlemleri sonucunda ~0,1–10,0 µm çapında fiberler üretilmiştir. Katkısız nişasta fiberlerin yanısıra HA ve çinko asetat katkılı fiberler de üretilmiş ve elde edilen bu biyokompozitlerin mikroyapısı taramalı elektron mikroskopuyla (SEM), yapısal karakterizasyonu Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ile faz analizi ise x-ışını kırınım (XRD) yöntemiyle incelenmiştir. Üretilen fiberlerin kemik enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan bakterilerden biri olan *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler

Doku iskelesi;
Elektro çekim; Fiber;
Hidroksiapatit;
Nişasta.

Production and Characterization of Hydroxyapatite–Starch Biocomposite Fibers Using Hydroxyapatite Synthesized from Bovine Bone

Abstract

In this study, hydroxyapatite-starch biocomposite fibers were produced and characterized by electrospinning method. Starch is the most abundant natural biopolymer in the world and is preferred in medical applications because of its biocompatibility, biodegradability and bioabsorbability. Hydroxyapatite (HA), the basic inorganic component of bone, is a widely preferred bioceramic for the preparation of composite tissue scaffolds with polymers for bone tissue repair applications. The HA used in the production of biocomposites obtained in this study was synthesized by calcination of bovine bones at 950 °C for 3 hours. XRD analysis showed that HA was the only phase detected in the structure of the synthesized powders, whereas scanning electron microscopy (SEM) studies showed that the powders had very homogeneous grain size and distribution. Fibers of ~0,1–10,0 µm diameter were produced by electrospinning method with 10 kV electrical field strength and 4 ml/h syringe feed rate by using 7.5 % starch by mass. Besides pure starch fibers, HA and zinc acetate reinforced fibers were produced and the microstructures of the biocomposites were investigated by SEM. Structural

Keywords

Electrospinning; Fiber;
Hydroxyapatite;
Scaffold; Starch.

characterization of the fibers was done by Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy and phase analysis was investigated via x-ray diffraction (XRD) analysis. The fibers showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, one of the most common bacteria in bone infections.

1. Giriş

Hastalık ya da kaza gibi nedenlerle işlev göremez hale gelmiş kemik dokusunun yerine yenisinin oluşturulması, yaşamın sağlıklı bir biçimde sürdürülebilmesi açısından oldukça önemlidir. Kemik kendini rejenere edebilme potansiyeli yüksek bir doku olmakla birlikte hasar veya kaybın büyük olduğu durumlarda; otogreft, allogreft kemik transplantasyonu gibi geleneksel tedavi yöntemlerine başvurulmaktadır. Çeşitli komplikasyonlara neden oldukları için bu yöntemler etkin bir tedavi sağlamakta yetersiz kalmakta ve böyle durumlarda doku mühendisliği uygulamalarına başvurulmaktadır. (Laurencin, Ambrosio, Borden, & Cooper Jr, 1999; Mistry & Mikos, 2005) Biyolojik dokuları taklit etme temeline dayanan doku mühendisliği yaklaşımları doku onarımı ya da üretimini amaçlamaktadır. Kemik doku mühendisliğinin ilk aşaması istenen özellikleri taşıyan bir doku iskelesinin tasarlanması ve üretilmesidir. (Hutmacher, 2000) Büyümekte olan hücrelere mekanik destek sağlayan kemik doku iskeleleri aynı zamanda biyolojik ve fizyolojik değişikliklere cevap vermek için çevre doku ile etkileşim sağlanmasına yardımcı olmaktadır. Bunun yanısıra hücre dışı matrisin yeniden oluşmasına da katkı sağlamaktadırlar. Dolayısıyla bir doku mühendisliği uygulamasının başarılı olabilmesi açısından doku iskelesinin rolü hayatidir. (Thein-Han & Misra, 2009) Doku iskelesinin beklenen etkiyi gösterebilmesi açısından kullanılacak malzemelerin seçimi önemlidir. İdeal bir doku iskelesi malzemesi vücut içine yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmayacak şekilde biyoyumlu olmalıdır. Bunun yanısıra hücre yapışmasını, büyümesini ve farklılaşmasını destekleyecek uygun yüzey kimyasına sahip olmalı ve yerleştirildiği bölgedeki doku ile bütünlük oluşturabilmelidir. Kullanılacak

olan malzemeler aynı zamanda ucuz, kolay üretilen, biyobozunur yapıda ve uygun gözenekliliğe sahip olmalıdır. (Boyan, Lohmann, Romero, & Schwartz, 1999; Yoshikawa & Myoui, 2005)

Kemik doku onarım uygulamalarında kemiğin yerini tutabilecek seramik, polimer, metal ve çeşitli organik/inorganik biyomalzemeler kullanılmaktadır. (Bucholz, Carlton, & Holmes, 1987; Cornell et al., 1991; Fujibayashi et al., 2003; Ishihara, Arai, Nakabayashi, Morita, & Furuya, 1992; Sartoris, Gershuni, Akesson, Holmes, & Resnick, 1986) Kalsiyum fosfat seramikleri ve bu biyoseramikler içerisinde kalsiyum/fosfor (Ca/P) oranı 1,67 olan hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) özellikle dikkat çekmektedir. (Cornell et al., 1991) Hidroksiapatit doğal kemiğin mineral bileşimine oldukça benzer bir kimyasal yapıya sahip olduğu için biyoyumluluğu oldukça yüksektir ve kemik greftlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. (Bucholz, Carlton, & Holmes, 1989; Holmes, Bucholz, & Mooney, 1987; Matsumine et al., 2004; Uchida et al., 1990; Yoshikawa, 1999) Biyoaktif ve osteokondüktif (hücre ve doku büyümesini destekleyen) özellikte bir seramik olan ve kemikle doğrudan kimyasal bağ yapabilen HA, bu özelliklerinden dolayı kemik doku iskelelerinde özellikle tercih edilmektedir. Bütün bu avantajlarına rağmen mekanik özelliklerinin zayıf olması HA'nın kullanımını sınırlamaktadır.

HA'nın sınırlayıcı özelliklerini geliştirmek, performansını arttırmak ve uygulama alanlarını genişletmek amacıyla son zamanlarda bu biyoseramiğin çeşitli malzemelerle kompozitleri üretilmekte ve böylece mekanik ve biyolojik özelliklerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir. (Gervaso, Scalera, Kunjalukkal Padmanabhan,

Sannino, & Licciulli, 2012) Bu amaca yönelik yaklaşımlardan biri HA–polimer kompozitlerin üretimidir. HA yapısına jelatin, kitin, kitosan, kollajen ve polilaktik asit (PLA) gibi organik bileşikler katılarak mekanik özelliklerinin iyileştirilmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. (Ramay & Zhang, 2003; Sengers, Taylor, Please, & Oreffo, 2007; Vercik, de Assis, Fook, dos Santos, & Guastaldi, 2003; Zhao, Grayson, Ma, Bunnell, & Lu, 2006) Adhezif, şişebilen ve jelleşebilen yapıda bir polimer olan nişasta, hidroksiapatit ile kompozit haline getirildiğinde iyi dağılım gösteren çözeltilerin ve dayanıklı seramik bünyelerin hazırlanmasında etkili bir şekilde kullanılabilir. (Miculescu et al., 2017a) Nişasta yeryüzünde en fazla bulunan doğal biyopolimerdir ve biyouyumluluk, biyobozunurluk ve biyoabsorplanabilirlik özellikleri sayesinde sentetik malzemelerin yerine kullanılabilir. Sentetik polimerlere kıyasla daha hidrofilik olan nişasta, herhangi bir allerjik reaksiyon veya toksik etkiye sebep olmadan insan vücudu tarafından absorplanabilir. Nişasta gibi doğal polimerler güvenli biyomalzemelerdir ve yaygın olarak çeşitli biyomedikal araştırmalarda kullanılmaktadırlar. (Thakur, Govender, Mamo, Tamulevicius, & Thakur, 2017; Thakur & Kessler, 2015; Voicu et al., 2016) HA'nın kompozit malzemelerde nişasta gibi doğal polimerlerle birlikte kullanımı HA'nın kırılma direncini azaltmakta ve farklı şekillerde işlenebilmesini mümkün kılmaktadır. (Miculescu et al., 2017a; Miculescu et al., 2017b) Bu biyopolimerler aynı zamanda HA'nın biyoaktivitesini artırabilecek özelliklere sahiplerdir. (Miculescu, Thakur, Miculescu, & Voicu, 2016; Thakur & Thakur, 2015; Thakur & Voicu, 2016) Gerek HA gerekse nişastanın biyouyumlu olmaları ve doğal kaynaklardan basit, ucuz ve güvenli yöntemlerle elde edilebilir olmaları, HA–nişasta kompozitlerinin medikal uygulamalarda sürdürülebilir malzemeler olarak kullanılmalarını mümkün kılmaktadır. (Oana et al., 2015; Patel, Telalović, Bitter, Worrell, & Patel, 2015; Yi, Lee, & Chung, 2014) Nişasta; yapıştırıcı, kemik çimentosu, kemik vaksları, kontrollü ilaç salım sistemleri veya doku iskeleleri gibi hidroksiapatit kompozitlerinde polimerik matris olarak ve ayrıca gözenekli hidroksiapatit

iskelelerinin üretiminde bağlayıcı olarak olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir. (Miculescu et al., 2017)

HA–nişasta gibi biyokompozitlerin üretiminde kullanılacak yöntemlerden biri elektro çekim yöntemidir. Bu metodla üretilen fiberler yüksek özgül yüzey alanı, üstün mekanik performans, yüksek gözeneklilik ve üretim kolaylığı gibi özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedirler. (Komur et al., 2017) Doku mühendisliği uygulamaları açısından da elektro çekim yöntemi ile üretilmiş fiberler özellikle avantajlı olmaktadır. Çünkü elektro çekim yöntemi, gözenekliliği ve yüzey alanı yüksek olan gevşek yapılı üç boyutlu matların oluşmasına imkân sağlamaktadır ki bu yapı hücre dışı matrisin yapısına oldukça benzer olduğu için doku mühendisliği uygulamalarına oldukça elverişlidir. (Agarwal, Wendorff, & Greiner, 2008)

Bu çalışmada doğal kemiğin mineral bileşimine oldukça benzer bir kimyasal yapıya sahip, osteokondüktif özellikte bir seramik olan HA ile doğal, biyouyumlu ve biyobozunur bir biyopolimer olan nişasta kullanılarak biyokompozit bir malzeme geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu iki malzemenin üstün özelliklerinin tek bir malzemede bir araya getirilmesiyle kemik doku onarımı gibi uygulamalarda kullanım potansiyeli olabilecek bir ürün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda elektro çekim yöntemi kullanılarak sığır kemliğinden sentezlenen hidroksiapatit ve çinko asetat takviyesiyle nişasta fiberlerin üretim ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Hidroksiapatit sentezi ve karakterizasyonu

Bu çalışmada kullanılan hidroksiapatit seramik tozları sığır kemiklerinden sentezlenmiştir. Yerel bir kasaptan temin edilen sığır kemikleri üzerlerindeki organik kısımların tamamen uzaklaştırılması için bir saat süreyle kaynatılmıştır. Ardından kemiklerin üzerinde kalan organik kısımlar mekanik olarak temizlenmiştir. Temizlenen kemikler kurutulduktan sonra 10°C/dakika ısıtma ve soğutma hızı

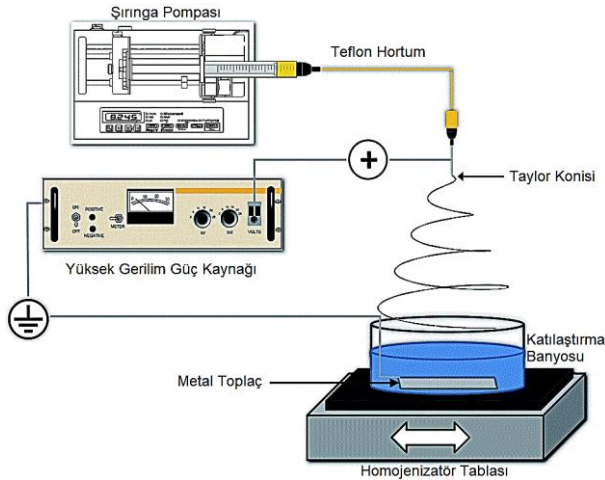
uygulanarak iki farklı sıcaklıkta; 850°C ve 950°C’de, 3 saat süreyle kalsine edilmiştir.

Kalsinasyonla sentezlenen seramik tozlar karakterizasyon çalışmaları ve fiber üretiminde kullanılmadan önce aksel değirmende 300 devir/dakika hızla 45 dakika süreyle yaş öğütme tabi tutulmuştur. Ardından da 100°C’de 48 saat süreyle kurutma işlemi uygulanmıştır.

Şıır kemiklerinden sentezlenen seramiğin faz analizi Bruker marka D8 model XRD cihazı ile Cu–K α radyasyonu ($\lambda=1.5406\text{Å}$) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen seramik fazın morfoloji ve tane boyutu ise Hitachi marka SU1510 model taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir.

2.2 Fiber üretim ve karakterizasyonu

Gerçekleştirilen bu çalışmada elektro çekim yöntemi ile şıır kemiğinden sentezlenen hidroksiapatit ve çinko asetat ile takviye edilen nişasta fiberler üretilmiştir. Elektro çekim yöntemi, uçucu çözücüler içinde çözülmüş çeşitli polimerlerden mikro ve nano boyutta fiberler hazırlamak için kullanılan çok yönlü bir metottur. Oda sıcaklığında kolayca buharlaşmayan iyonik çözücülerde çözülmüş polimerler için ıslak elektro–çekim adı verilen bir yöntem uygulanmakta ve fiber toplamak için bir katılaştırma banyosu kullanılmaktadır. (Zheng et al., 2014)



Şekil 1. ıslak elektro–egirme cihazına ait şemantik gösterim (Zheng et al. 2014)

Yapılan çalışmada Tekkim firmasından temin edilen mısır nişastası kullanılarak ağırlıkça %7,5 oranında mısır nişastası/DMSO solüsyonu hazırlanmıştır. Çekim işlemleri, 10 kV elektriksel alan şiddeti, şırınga iğnesi ile toplaç arasındaki mesafe 7 cm ve 4 ml/sa şırınga besleme hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yatay bir eksende gelgit hareketi yapan ve katılaştırma banyo sıvısı olarak etanol içeren bir petri kabı ıslak toplaç olarak kullanılmıştır. Katkısız, çinko asetat katkılı, hidroksiapatit katkılı ve çinko asetat + hidroksiapatit katkılı olmak üzere toplam dört farklı sistemde fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Katkılı numuneler için nişasta miktarının kütlece %20’si kadar hidroksiapatit ve çinko asetat kullanılmıştır. Elektro çekim işlemleri normal atmosferik ortamda oda sıcaklığı ve nem koşullarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fiberler filtreden geçirildikten sonra etanol ile yıkanmış, sonrasında ise 70 °C’de vakumlu etüvde 2 saat süreyle kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra 40 °C’deki vakumlu etüv içerisinde, 24 saat süreyle glutaraldehit buharında bekletilerek çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fiberlerden glutaraldehit kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla numuneler oda sıcaklığında atmosferik ortamda 24 saat bekletilmiş ve daha sonra karakterizasyon çalışmalarında kullanılmışlardır.

2.3 Antibakteriyel aktivite testi

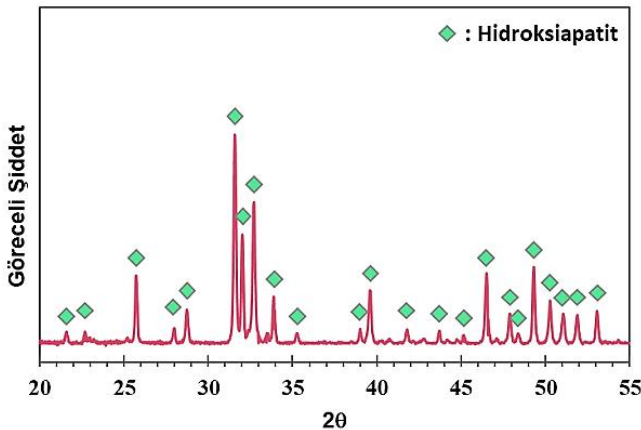
Elektro çekim yöntemi ile hazırlanmış fiberler 5 mg ağırlığında tartıldıktan sonra 60 dk boyunca UV ışık altında tutularak sterilize edilmiştir. Nutrient Agar plağına ekilmiş olan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) stok kültüründen tek bir koloni alınarak Nutrient Broth besiyerine inokülasyon yapılmış ve bir gece boyunca 37 °C’de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda bakteri kültürü 10⁸ cfu/ml olacak şekilde Nutrient Broth besiyeri kullanılarak seyreltilmiştir. Sterilize edilmiş olan fiber örneklerinin üzerine seyreltilmiş olan bakteri kültüründen 1 ml ilave edilmiş ve 5 saat boyunca 250 rpm, 37 °C’de inkübe edilmiştir. İçerisine fiber örneği ilave edilmemiş 1 ml bakteri kültürü de aynı şekilde inkübe edilmiş ve kontrol

olarak kullanılmıştır. 5 saatlik inkübasyon süresi sonunda bakteri kültüründen 100 µl örnek alınarak Nutrient Agar plaklarına yayma yöntemiyle ekim yapılmış ve 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir plakta üreyen bakteri miktarı kontrol ile karşılaştırılarak, üretilmiş olan fiberlerin antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca uygun oranlarda seri dilüsyonlar yapıldıktan sonra da aynı şekilde yayma yöntemiyle ekim yapılarak her bir plakta üreyen koloni sayısı belirlenmiştir.

3. Bulgular

3.1 Faz Analizi

Sığır kemiğinden 950°C'de 3 saat süreyle kalsinasyon sonucunda elde edilen seramik numunelere ait faz analizi sonuçları Şekil 1'de verilmektedir. Gerçekleştirilen XRD analizleri her iki sıcaklıkta (850°C ve 950°C) sentezlenen tozların faz bileşiminin aynı olduğunu ve yapıda sadece hidroksiapatit fazının (JCPDS 9-432) bulunduğunu göstermiştir (Şekil 2). Literatür incelendiğinde Maidaniuc ve arkadaşları (Maidaniuc et al., 2018) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da sığır kemiklerinin 1200°C'de 4 saat süreyle kalsinasyonu sonucunda yapıda sadece hidroksiapatit fazının (JCPDS 9-432) belirlendiği bildirilmektedir. Benzer şekilde Shirazi ve arkadaşları (Asgharzadeh Shirazi, Ayatollahi, & Beigzadeh, 2016) tarafından yapılan bir çalışmada da sığır kemikleri 900°C'de 2 saat süreyle kalsine edilerek sadece hidroksiapatit fazının (JCPDS 9-432) sentezi gerçekleştirilmiştir.

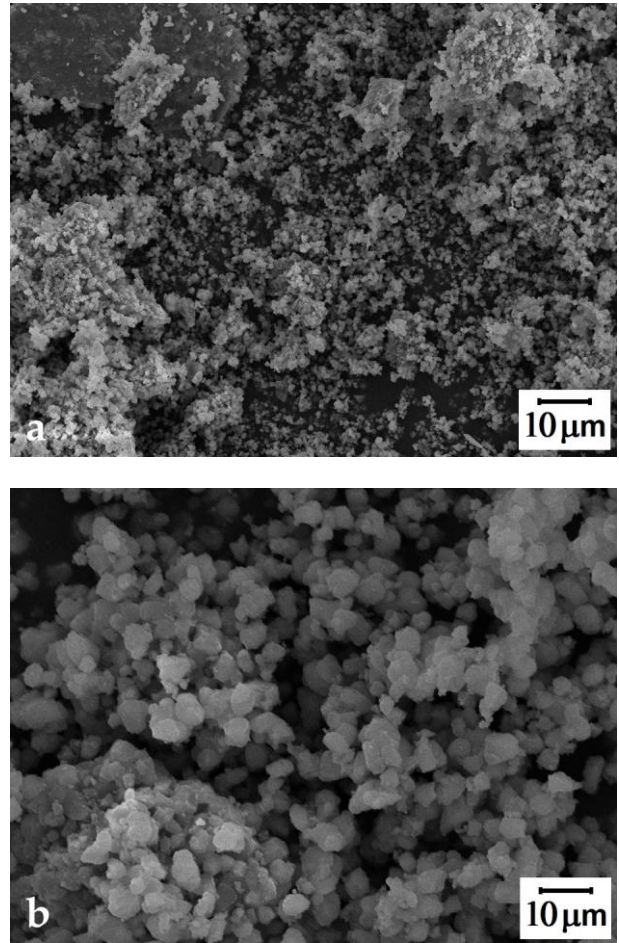


Şekil 2. Sığır kemiğinin 950°C'de 3 saat süreyle

kalsinasyonu sonucunda sentezlenen biyoseramiklere ait XRD analiz sonucu.

3.2 Mikroyapı İncelemeleri

Sığır kemiğinden 950°C'de 3 saat süreyle kalsinasyon ile sentezlenen hidroksiapatite ait SEM görüntüleri Şekil 3'de sunulmaktadır. SEM incelemeleri sentezlenen tozların oldukça homojen bir tane boyut ve dağılımına sahip olduğunu göstermiştir. Ortalama tane boyutunun 1-2 µm olduğu belirlenmiştir.



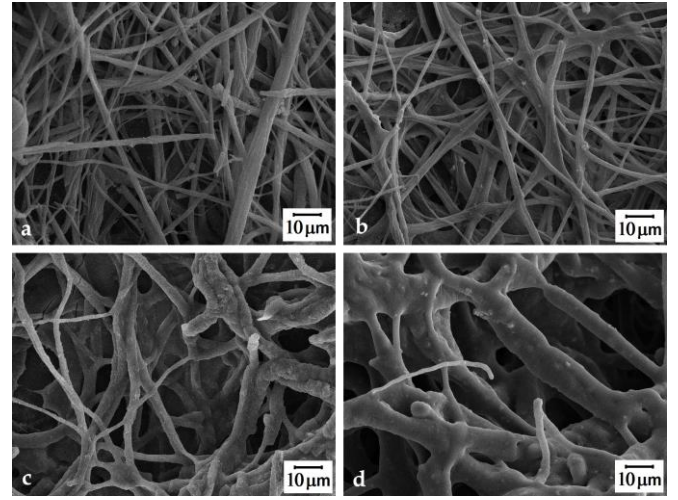
Şekil 3. Sığır kemiğinin 950°C'de 3 saat süreyle kalsinasyonu sonucunda sentezlenen hidroksiapatite ait (a) 1 kX ve (b) 5 kX büyütmelelerdeki SEM görüntüleri.

Elektro çekim yöntemiyle polimerlerden fiber üretilmesinde önemli konulardan biri polimerin yeterince çözünmesini sağlayacak uygun çözücünün kullanılmasıdır. Çözücü olarak su kullanıldığında nişastadan fiber üretiminde başarılı olunamamıştır. Nişasta polimerini oluşturan sarmal

zincirlerin açılmasını sağlamadan sürekli bir fiber oluşumu gerçekleştirmek mümkün değildir. Nişasta amiloz ve amilopektin adı verilen iki polimerin karışımından oluşur. Amiloz doğrusal bir polisakkarit iken amilopektin dallanmış yapıdadır. Nişastadaki amiloz sarmalları belli konsantrasyondaki sıvı dimetil sülfoksit (DMSO) içinde düz bir yapıda bulunur. Bu nedenle DMSO nişastanın elektro çekiminde kullanılabilir uygun bir çözücü adaydır. Ancak DMSO'nun uçuculuğu elektro çekim işlemlerinde kullanılan diğer çözücülere oranla daha düşüktür. Dolayısıyla nişasta çekim işlemi sırasında jet oluşumuna izin verecek şekilde çözülmüş olsa da, DMSO çözeltisi normal atmosfer koşullarında yeterince buharlaşmadığı için kollektör üzerinde katı fiber birikiminin sağlanmasında güçlük yaşanmaktadır. Bu durum ıslak elektro çekim adı verilen yöntemin kullanılmasıyla aşılmaya çalışılmıştır. Bu yöntem teorik olarak DMSO'nun çözündüğü fakat nişastanın içerisinde çözünmediği bir çözücü içeren koagülasyon banyosunun kullanımına dayanır. Solusyon jeti koagülasyon banyosuna ulaştığında DMSO çözünecek, nişasta ise çözünmediği için fiber halinde çökelecektir. (Kong & Ziegler, 2014) Böylece başarılı bir şekilde fiber üretimi gerçekleştirilmiş olacaktır. Yukarıda açıklanan nedenlerden dolayı nişasta fiberlerinin üretiminde, kullanılacak olan çözücü ve koagülasyon banyosunun seçimi önemlidir. Nişastanın elektro çekim başarısını etkileyen değişkenlerden bir diğeri ise kullanılan nişastanın amiloz/amilopektin oranıdır. Doğrusal yapıda olmasından dolayı amiloz içeriği yüksek olan nişasta kullanıldığında fiber üretim başarısı daha yüksek olmaktadır.

Yapılan çalışmada üretilen katkısız ve katkılı nişasta fiberlerine ait taramalı elektron mikroskopu görüntüleri Şekil 4'te sunulmaktadır. Katkısız nişasta fiber (Şekil 4-a) ve hidroksiapatit katkılı nişasta fibere ait (Şekil 4-b) SEM görüntüleri incelendiğinde iki fiber sisteminde çok benzer yapıların elde edildiği görülmektedir. Katkısız nişasta fiber (Şekil 4-a) ve hidroksiapatit katkılı nişasta fiberlerin (Şekil 4-b) çapının genel olarak

0,1–6 μm aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Ancak çinko asetat katkılı nişasta fiber (Şekil 4-c) ve hidroksiapatit + çinko asetat katkılı nişasta fiber (Şekil 4-d) sistemlerinde elde edilen fiberlerin çaplarının çok değişken olduğu ve yapılarının da çok heterojen olduğu görülmektedir. Ancak çinko asetat katkılı nişasta fiber (Şekil 4-c) ve hidroksiapatit + çinko asetat katkılı nişasta fiberlerin (Şekil 4-d) çaplarının ilk iki sisteme oranla daha geniş bir aralıkta (0,2–10 μm) değiştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca bu iki sistemde, ilk iki sisteme oranla yüzey pürüzlülüğünün de önemli oranda artmış olduğu gözlemlenmiştir.

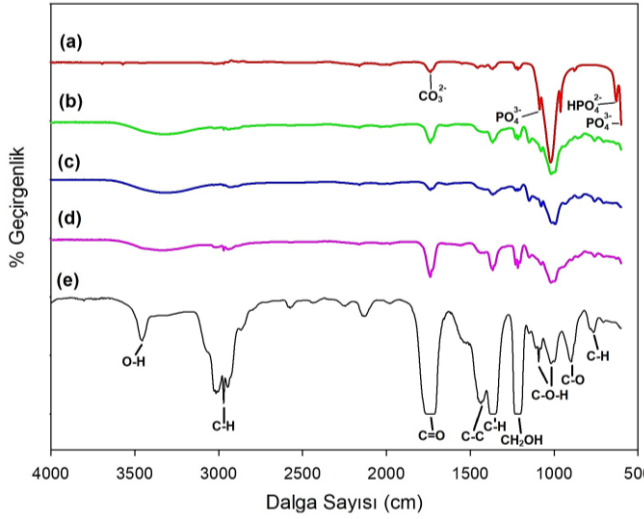


Şekil 4. Üretilen nişasta fiberlere ait 1 kX büyütmeledeki SEM görüntüleri; a) katkısız nişasta fiber, (b) hidroksiapatit katkılı nişasta fiber, (c) çinko asetat katkılı nişasta fiber ve (d) hidroksiapatit + çinko asetat katkılı nişasta fiber.

3.3 FTIR Analizi

Üretilen fiberlerde kimyasal yapıda meydana gelen değişimlerin incelenebilmesi için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Dört farklı fiberin analizi sonucunda elde edilen spektrumlar karşılaştırmalı olarak Şekil 5'de sunulmaktadır. Nişastaya ait olan spektrumda 3460 cm^{-1} bölgesindeki pik O–H gerilme titreşimine, 1648 cm^{-1} deki pik amorf bölgedeki bağlı suya ait –OH makaslama titreşimine, 1155 cm^{-1} deki pik C–O–H grubundaki C–O gerilme titreşimine, 2970 cm^{-1} deki pik alifatik C–H gerilme titreşimine aittir (Şekil 5-e). Ayrıca 1735 cm^{-1} bölgesinde

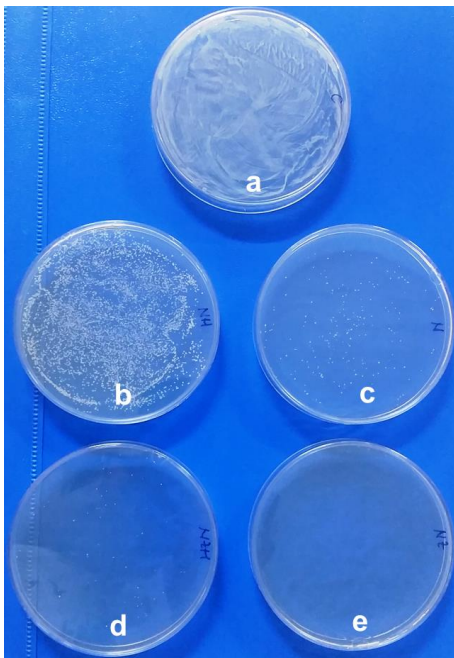
görülen pik C=O adsorbsiyonuna işaret etmektedir. (Hebeish, Aly, El-Shafei, & Zaghloul, 2009) Hidroksiapatitin FTIR spektrumu incelendiğinde (Şekil 5–a) yapısında bulunan PO_4^{3-} e ait karakteristik asimetrik P–O germe bandı 1086 cm^{-1} ve 1024 cm^{-1} de gözlemlenmiştir. Simetrik P–O germe bandı ise 964 cm^{-1} de belirlenmiştir.



Şekil 5. Numunelere ait FTIR analiz sonucu elde edilen spektrumlar; (a) hidroksiapatit toz, (b) hidroksiapatit katkıli nişasta fiber, (c) çinko asetat katkıli nişasta fiber, (d) hidroksiapatit + çinko asetat katkıli nişasta fiber ve (e) nişasta fiber.

3.4 Antibakteriyel Aktivite Testi

Üretilen nişasta fiberlerin *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktiviteleri Şekil 6'da sunulmaktadır.



Şekil 6. Nişasta fiberlerin *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktiviteleri. (a) kontrol (b) HA katkıli nişasta fiber (c) katkısiz nişasta fiber (d) HA ve çinko asetat katkıli nişasta fiber (e) çinko asetat katkıli nişasta fiber.

Sonuçlar fiber ilave edilen kültürlerin tamamında canlı bakteri sayısının kontrole (fiber ilave edilmeyen bakteri kültürü) kıyasla ciddi oranda azaldığını göstermektedir. Çizelge 1'de fiber ilave edilen ve edilmeyen *S. aureus* kültürlerindeki koloni sayıları verilmektedir.

Çizelge 1. Fiber ilave edilen ve edilmeyen (kontrol) *S. aureus* kültürlerinin $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 5 saatlik inkübasyonu sonucunda belirlenen koloni (kob/ml) sayıları.

Fiber	Koloni sayısı (kob/ml)
Katkısız nişasta fiber	1.9×10^3
HA katkıli nişasta fiber	7.9×10^4
Çinko katkıli nişasta fiber	0
HA ve çinko katkıli nişasta fiber	6.3×10^2
Kontrol	5.6×10^8

Fiberlerin üzerine başlangıçta ilave edilen bakteri kültürü 10^8 kob/ml iken 5 saatlik inkübasyon süresi sonunda bu oran katkısiz nişasta fiber, hidroksiapatit katkıli nişasta fiber ve hidroksiapatit ile çinko asetat katkıli nişasta fiberlerin ilave edildiği kültürlerde önemli oranda azalmıştır. Çinko asetat katkıli nişasta fiberlerin ilave edildiği durumda ise bütün bakteriler ölecek, canlı bakteri sayısı sıfıra düşmüştür. Çinko canlılık açısından esansiyel bir metal iyonu olmasına karşın belirli dozlarda bakterilerin gelişimini inhibe edebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı çeşitli biyomalzemelerin üretiminde katkı olarak kullanılmakta ve geliştirilen biyomalzemeye antibakteriyel özellik kazandırılmasında yararlanılmaktadır. Yapılan bu çalışmada fiber yapısına katılan çinko asetat benzer şekilde fiberlere antibakteriyel aktivite kazandırmıştır. Katkısız nişasta fiberlerin antibakteriyel aktivite göstermesi beklenmezken bu fiberlerde de bakteri gelişimi önemli oranda inhibe olmuştur. Bu durum

fiberlerin üretim sürecinde kullanılan dimetil sülfoksit ve glutraldehit gibi kimyasal kalıntılarının bakteri gelişimini etkilemiş olabileceğine işaret etmektedir. Zira nişasta toksik etkisi olmayan, biyoyumlu bir malzemedir. Hidroksiapatit katkılı nişasta fiberlerin ilave edildiği kültürdeki bakteri sayısı katkısız nişasta fiberlerin ilave edildiği kültüre kıyasla önemli oranda artmıştır. Benzer şekilde çinko katkılı nişasta fiberlerin ilave edildiği kültürde canlı bakteriye ratlanmazken bu fiberlerin yapısına hidroksiapatit ilave edildiğinde düşük de olsa bakteri gelişimi gözlenmiştir. Bu durum fiber yapısına hidroksiapatit katılmasının bakteri gelişimini desteklediğine işaret etmektedir.

4. Tartışma ve Sonuç

- Bu çalışmada yerel bir işletmeden temin edilen siğır kemiklerinin temizlendikten sonra iki farklı sıcaklıkta; 850°C ve 950°C'de 3 saat süreyle kalsinasyonu sonucu hidroksiapatit biyoseramiği sentezlenmiştir. Gerçekleştirilen XRD analizinde yapıda hidroksiapatit dışında herhangi bir faza rastlanmamıştır.
- Siğır kemiği hidroksiapatit biyoseramiğinin üretimi için oldukça uygun bir kaynaktır. Bu kaynağın oldukça ekonomik oluşu, kolay elde edilebilmesi ve siğır kemiğinden hidroksiapatit sentez sürecinin kalsinasyon gibi basit bir yöntemle gerçekleştirilebilmesi önemli avantajlar sağlamaktadır.
- Bu çalışmada elektro çekim yöntemiyle nişasta fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Ardından da sentezlenen hidroksiapatit nişasta fiberde takviye olarak kullanılmıştır. Ayrıca çinko asetat takviyeli nişasta fiber ve hidroksiapatit + çinko asetat katkılı nişasta fiber üretimleri gerçekleştirilmiştir.
- Katkısız nişasta fiber ve hidroksiapatit katkılı nişasta fiber sistemlerinde birbirine oldukça benzer fiber yapılarının elde edildiği belirlenmiştir. Bu iki sistemde üretilen fiberlerin çapının genel olarak 0,1–6 µm aralığında değiştiği gözlemlenmiştir.
- Ancak çinko asetat katkılı nişasta fiber ve hidroksiapatit + çinko asetat katkılı nişasta fiber sistemlerinde elde edilen fiberlerin çaplarının çok değişken olduğu ve yapılarının da çok heterojen olduğu belirlenmiştir. Bu iki sistemdeki fiberlerin çaplarının daha geniş bir aralıkta (0,2–10 µm) değiştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca bu iki sistemde, ilk iki sisteme oranla

yüzey pürüzlülüğünün de önemli oranda artmış olduğu gözlemlenmiştir.

- Literatürde nişasta fiberlerin elektro çekim yöntemiyle üretimi ile ilgili belli sayıda yayın bulunmasına rağmen üretim sürecini güçleştiren çeşitli parametrelerden dolayı henüz koşullar optimize edilmiş değildir. Bu çalışmada gerçekleştirilmiş olan HA-nişasta fiberlerin elektro çekim yöntemiyle üretimine dair herhangi bir yayına ise tarafımızca ulaşılamamıştır. Dolayısıyla gerçekleştirilen bu çalışma alanında öncül niteliğindedir.
- Elde edilmiş olan fiberlerin özellikleri henüz en iyi hale getirilememiştir. Fiber üretimi açısından önemli değişkenler olan polimer miktarı, kullanılan çözücünün derişimi, koagülasyon banyosunun içeriği, nişastanın amiloz oranı gibi parametrelerde değişikliğe gidilerek daha homojen yapıda fiber elde edilmesi için çalışmalar yapılacaktır.

5. Kaynaklar

- Agarwal, S., Wendorff, J. H., & Greiner, A. 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49(26): 5603-5621.
- Boyan, B. D., Lohmann, C. H., Romero, J., & Schwartz, Z. 1999. Bone and cartilage tissue engineering. *Clinics in plastic surgery*, 26(4): 629-645, ix.
- Bucholz, R. W., Carlton, A., & Holmes, R. 1989. Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clinical orthopaedics and related research*(240): 53-62.
- Bucholz, R. W., Carlton, A., & Holmes, R. E. 1987. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *The Orthopedic clinics of North America*, 18(2): 323-334.
- Cornell, C. N., Lane, J. M., Chapman, M., Merkow, R., Seligson, D., Henry, S., Gustilo, R., & Vincent, K. 1991. Multicenter trial of Collagraft as bone graft substitute. *Journal of orthopaedic trauma*, 5(1): 1-8.
- Fujibayashi, S., Kim, H.-M., Neo, M., Uchida, M., Kokubo, T., & Nakamura, T. 2003. Repair of segmental long bone defect in rabbit femur using bioactive titanium cylindrical mesh cage. *Biomaterials*, 24(20): 3445-3451.
- Gervaso, F., Scalera, F., Kunjalukal Padmanabhan, S., Sannino, A., & Licciulli, A. 2012. High-Performance hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 9(3): 507-516.
- Hebeish, A., Aly, A., El-Shafei, A., & Zaghoul, S. 2009. Synthesis and Characterization of Cationized Starches for Application in Flocculation, Finishing and Sizing. *Egypt. J. Chem.*, 52: 73-89.
- Holmes, R. E., Bucholz, R. W., & Mooney, V. 1987. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in

- diaphyseal defects: a histometric study. *Journal of orthopaedic research*, 5(1): 114-121.
- Hutmacher, D. W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *The biomaterials: Silver jubilee compendium*: 175-189: Elsevier.
- Ishihara, K., Arai, J., Nakabayashi, N., Morita, S., & Furuya, K. 1992. Adhesive bone cement containing hydroxyapatite particle as bone compatible filler. *Journal of biomedical materials research*, 26(7): 937-945.
- Komur, B., Bayrak, F., Ekren, N., Eroglu, M. S., Oktar, F. N., Sinirlioglu, Z. A., Yucel, S., Guler, O., & Gunduz, O. 2017. Starch/PCL composite nanofibers by co-axial electrospinning technique for biomedical applications. *BioMedical Engineering OnLine*, 16(1): 40.
- Kong, L., & Ziegler, G. R. 2014. Fabrication of pure starch fibers by electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 36, 20–25.
- Laurencin, C. T., Ambrosio, A., Borden, M., & Cooper Jr, J. 1999. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annual review of biomedical engineering*, 1(1): 19-46.
- Matsumine, A., Myoui, A., Kusuzaki, K., Araki, N., Seto, M., Yoshikawa, H., & Uchida, A. 2004. Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery: a long-term follow-up study. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 86(5): 719-725.
- Miculescu, F., Maidaniuc, A., Voicu, S. I., Thakur, V. K., Stan, G., & Ciocan, L. 2017a. Progress in hydroxyapatite–starch based sustainable biomaterials for biomedical bone substitution applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(10): 8491-8512.
- Miculescu, F., Mocanu, A.-C., Dascălu, C. A., Maidaniuc, A., Batalu, D., Berbecaru, A., Voicu, S. I., Miculescu, M., Thakur, V. K., & Ciocan, L. T. 2017b. Facile synthesis and characterization of hydroxyapatite particles for high value nanocomposites and biomaterials. *Vacuum*, 146: 614-622.
- Miculescu, M., Thakur, V. K., Miculescu, F., & Voicu, S. I. 2016. Graphene-based polymer nanocomposite membranes: a review. *Polymers for Advanced Technologies*, 27(7): 844-859.
- Mistry, A. S., & Mikos, A. G. 2005. Tissue engineering strategies for bone regeneration, *Regenerative medicine II*: 1-22: Springer.
- Oana, K., Kobayashi, M., Yamaki, D., Sakurada, T., Nagano, N., & Kawakami, Y. 2015. applicability assessment of ceramic microbeads coated with hydroxyapatite-binding silver/titanium dioxide ceramic composite earthplus™ to the eradication of Legionella in rainwater storage tanks for household use. *International journal of nanomedicine*, 10: 4971.
- Patel, A. D., Telalović, S., Bitter, J. H., Worrell, E., & Patel, M. K. 2015. Analysis of sustainability metrics and application to the catalytic production of higher alcohols from ethanol. *Catalysis today*, 239: 56-79.
- Ramay, H. R., & Zhang, M. 2003. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. *Biomaterials*, 24(19): 3293-3302.
- Sartoris, D., Gershuni, D., Akesson, W., Holmes, R., & Resnick, D. 1986. Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes: preliminary report of radiographic evaluation. *Radiology*, 159(1): 133-137.
- Sengers, B. G., Taylor, M., Please, C. P., & Oreffo, R. O. 2007. Computational modelling of cell spreading and tissue regeneration in porous scaffolds. *Biomaterials*, 28(10): 1926-1940.
- Thakur, S., Govender, P. P., Mamo, M. A., Tamulevicius, S., & Thakur, V. K. 2017. Recent progress in gelatin hydrogel nanocomposites for water purification and beyond. *Vacuum*, 146: 396-408.
- Thakur, V. K., & Kessler, M. R. 2015. Self-healing polymer nanocomposite materials: A review. *Polymer*, 69: 369-383.
- Thakur, V. K., & Thakur, M. K. 2015. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72: 834-847.
- Thakur, V. K., & Voicu, S. I. 2016. Recent advances in cellulose and chitosan based membranes for water purification: a concise review. *Carbohydrate polymers*, 146: 148-165.
- Thein-Han, W., & Misra, R. 2009. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 5(4): 1182-1197.
- Uchida, A., Araki, N., Shinto, Y., Yoshikawa, H., Kurisaki, E., & Ono, K. 1990. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 72(2): 298-302.
- Vercik, L. d. O., de Assis, C., Fook, M., dos Santos, M., & Guastaldi, A. C. 2003. Recobrimento de apatitas in vitro sobre titânio: influência do tratamento térmico. *Eclética química*: 25-31.
- Voicu, S. I., Condruz, R. M., Mitran, V., Cimpean, A., Miculescu, F., Andronescu, C., Miculescu, M., & Thakur, V. K. 2016. Sericin covalent immobilization onto cellulose acetate membrane for biomedical applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3): 1765-1774.
- Yi, Y.-B., Lee, J.-W., & Chung, C.-H. 2014. Sustainable approach to catalytic conversion of starch-based biomaterials into hydroxymethylfurfural using ionic liquids. *Current Organic Chemistry*, 18(9): 1149-1158.
- Yoshikawa, H. 1999. Clinical application of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. *Handbook of Biomaterials Engineering*.
- Yoshikawa, H., & Myoui, A. 2005. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of Artificial Organs*, 8(3): 131-136.
- Zhao, F., Grayson, W. L., Ma, T., Bunnell, B., & Lu, W. W. 2006. Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan–gelatin polymer network on human mesenchymal

stem cell construct development. *Biomaterials*, 27(9): 1859-1867.

Zheng, Y. , Miao, J., Maeda, N., Frey, D., Linhardt, R.J., and Simmons, T.J., 2014. Uniform nanoparticle coating of cellulose fibers during wet electrospinning. *Journal of Materials Chemistry A*, Issue 36, 2, 15029-15034.