

## Sığır kemiğinden elde edilen hidroksiapatit ile polimerik sünger yöntemiyle doku iskelesi üretimi ve karakterizasyonu

Gülsüm AYDIN<sup>1</sup>, Fatma Nur PARIN<sup>2</sup>, Kenan YILDIRIM<sup>2</sup>, Ayşe KALEMTAŞ<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Konya.

<sup>2</sup>Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Lif ve Polimer Mühendisliği Bölümü, Bursa.

<sup>3</sup>Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Bursa.  
e-posta: ayse.kalemtas@btu.edu.tr

Geliş Tarihi: 26.08.2019; Kabul Tarihi: 12.09.2019

### Öz

Yerel bir işletmeden temin edilen sığır kemikleri temizlendikten sonra 850° ve 950°C'de üç saat süreyle kalsine edilmiştir. XRD analizi kalsinasyon sonucunda yapıda sadece hidroksiapatit fazının bulunduğunu göstermiştir. Sentezlenen hidroksiapatit kullanılarak polimerik sünger yöntemiyle doku iskeleleri hazırlanmıştır. Çalışmada 10, 20 ve 30 ppi gözenek boyutuna sahip üç farklı sünger kullanılmıştır. Hazırlanan doku iskelelerinin 1150°C ve 1200°C'de 1,5 saat süreyle sinterlenmesi sonrası oldukça yüksek gözenek miktarına sahip doku iskeleleri elde edildiği belirlenmiştir. İyapı analizleri taramalı elektron mikroskobu, faz analizleri x-ışını kırınım yöntemi ve hidroksiapatit yapısındaki fonksiyonel gruplar Fourier Dönüşüm Kızılötesi spektroskopisi ile incelenmiştir. Hazırlanan doku iskelelerinin oldukça homojen bir iyapıya sahip olduğu ve tane boyut dağılımının nispeten dar (~1–3 µm) olduğu gözlemlenmiştir.

#### Anahtar kelimeler

Hidroksiapatit; Sığır kemiği; Kalsinasyon; Doku iskelesi; Polimerik sünger yöntemi; Gözenekli seramik.

## Production and Characterization of Tissue Scaffolds via Polymeric Sponge Method by Using Bovine Bone–Derived Hydroxyapatite

### Abstract

In this study, bovine bones are supplied from a local company. After cleaning procedures, bovine bones are heat treated at 850° and 950°C for 3 hours. XRD analysis revealed that hydroxyapatite was the only phase formed at these two samples. Tissue scaffolds were prepared via polymeric sponge method by using these synthesized hydroxyapatites. Three different size polymeric sponges, 10, 20 and 30 ppi were used in the study. Highly porous scaffolds were obtained after sintering at 1150° and 1200°C for 1.5 hours. Microstructure analyses were investigated by scanning electron microscopy, phase analysis by x-ray diffraction method and functional groups were examined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. It was observed that the tissue scaffolds had a very homogeneous microstructure, and the particle size distribution was relatively narrow (~1–3 µm).

#### Keywords

Hydroxyapatite; Bovine bone; Calcination; Tissue scaffold; Polymeric sponge method; Porous ceramics.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

### 1. Giriş

Hasar görmüş doku ve organların tamiri veya yeniden üretilmesi alanında seramik esaslı doku iskelelerinin kullanılması önemli avantajlar

sağlamaktadır. İdeal bir doku iskelesinin, biyoyumlu, doku oluşumu ve gelişimine olanak sağlayan, kütle transferine uygun ve birbirine bağlı gözenek morfolojisine sahip olması gerekmektedir. Doku iskelelerinin gözenek boyut ve dağılımı,

gözenek mimarisi, kimyasal yapısı, yüzey topolojisi, hidrofiliği ve bozunabilirliği son derece önemlidir. Ayrıca sahip olduğu gözenekli yapısının birbiriyle bağlantılı halde olması hasarlı dokulara hücre taşınımı ve tutunması açısından da oldukça önemlidir.

Yüksek oranda gözenek içeriğine sahip seramik malzemeler farklı yöntemler kullanılarak üretilmektedir. (Hammel, Ighodaro, & Okoli, 2014; Kalemtaş et al., 2013; Kalemtaş, Özey, & Aydın, 2018; Studart, Gonzenbach, Tervoort, & Gauckler, 2006) Bu çalışmada birbiriyle bağlantılı, uygulama alanında ihtiyaç duyulan gözenek boyut ve dağılımına sahip, açık gözenekli hidroksiapatit doku iskeleleri polimerik sünger yöntemiyle üretilmiştir. Polimerik sünger yöntemi Karl ve Somers (Karl & Somers, 1963) tarafından 1963 yılında geliştirilmiş olup günümüzde gözenekli seramik üretiminde kullanılmakta olan en yaygın yöntemlerden biridir. Bu yöntemde öncelikle kararlı ve göreceli olarak yüksek katı oranına sahip olacak şekilde hazırlanan bir seramik çamur içerisinde polimerik sünger daldırılarak çamurun sünger yüzeyine homojen bir şekilde kaplanması sağlanır. Seramik çamurla kaplanan polimerik sünger oda sıcaklığında kurutma işlemine tabi tutulur. Kurutma sonrası uygulanan bağlayıcı giderme işlemiyle polimerik sünger ve çamur hazırlama sürecinde kullanılmış olan organik ilavelerin yakılarak sistemden uzaklaştırılması sağlanır. Son aşamada ise tasarlanan bileşime bağlı olarak seramik malzemenin sinterleme işlemi gerçekleştirilir. Polimerik sünger yöntemi nispeten ekonomik oluşu ve kolay uygulanabilir olması gibi önemli avantajlara sahiptir.

Hidroksiapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) sahip olduğu mükemmel biyoyumluluk ve biyoaktivite özellikleri dolayısıyla diş, ortopedi, ilaç taşınımı ve çeşitli implant uygulamalarında en yaygın olarak kullanılmakta olan seramikler arasında yer almaktadır. (Koutsopoulos, 2002; Ong & Chan, 2000; Venkatesan & Kim, 2014; Zakaria, Sharif Zein, Othman, Yang, & Jansen, 2013) Hidroksiapatit seramikler sentetik olarak üretildiği gibi doğal hammaddelerden de üretilmektedir. Doğal hidroksiapatit ve stokiometrik olarak hazırlanmış

olan sentetik hidroksiapatit incelendiğinde kimyasal bileşimleri ve vücut içerisindeki etkileşimlerinde belirgin farklılıklar olduğu anlaşılmaktadır. Sentetik hidroksiapatit büyük ölçüde saf olarak üretildiği halde, doğal insan kemğinde bulunan hidroksiapatit içerisinde ise pek çok farklı iyonun (temelde  $\text{CO}_3^{2-}$  iyonları ve az miktarda da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^{-1}$ ,  $\text{F}^{-1}$ , vb.) bulunduğu ve doğal hidroksiapatitin stokiometrik olmadığı görülmektedir. Sentetik olarak üretilen hidroksiapatit için Ca/P molar oranı 1,67 iken, doğal hidroksiapatit için ise bu değer genellikle  $<1,67$ 'dir. Hidroksiapatit istiridyeye (Rujitanapanich, Kumpapan, & Wanjanoi, 2014; Wu, Hsu, Hsu, Tseng, & Ho, 2019; Wu, Hsu, Wu, & Ho, 2011), balık (Huang, Hsiao, & Chai, 2011; Ozawa & Suzuki, 2002; Terzioğlu, Öğüt, & Kalemtaş, 2018), yumurta kabuğu (Abdulrahman et al., 2014; Gergely et al., 2010; Oliveira, Benelli, & Amante, 2013), mercan (Ripamonti, Crooks, Khoali, & Roden, 2009; Roy & Linnehan, 1974; Sivakumar, Kumar, Shantha, & Rao, 1996) ve sığır kemikleri (Callan & Rohrer, 1993; Jang & Kang, 2002; Ooi, Hamdi, & Ramesh, 2007) gibi pek çok doğal malzemedeki kalsinasyon, çöktürme ve hidrotermal sentez gibi farklı yöntemler kullanılarak sentezlenebilmektedir. Bu çalışmada kullanılan hidroksiapatit sığır kemiklerinden kalsinasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Böylece ekonomik bir başlangıç malzemesiyle hidroksiapatit üretimi gerçekleştirilmiştir. Sentez yöntemi olarak da kolay uygulanabilir ve ekonomik olmasının yanısıra iyi sonuçlar verdiği literatür araştırmalarından bilinen kalsinasyon yöntemi tercih edilmiştir.

## **2. Materyal ve Yöntem**

Bu çalışmada doku iskelesi üretiminde kullanılan hidroksiapatit seramik tozları sığır kemiklerinden sentezlenmiştir. Konya'da yerel bir kasaptan temin edilen sığır kemikleri kaynatma ve mekanik temizleme süreçleri ile organik bileşenlerden olabildiğince temizlenmiştir. Gerçekleştirilen temizlik işlemleri sonrası sığır kemikleri etüvde 48 saat süreyle kurutulmuştur. Hidroksiapatit sentezi kalsinasyon yöntemiyle iki farklı sıcaklıkta (850°C ve

950°C'de), 3 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Kalsinasyon sürecinde 10°C/dakika ısıtma ve soğutma hızı uygulanmıştır.

Kalsinasyon yöntemiyle sentezlenen seramik tozlar doku iskelesi üretiminde kullanılmadan önce Fritsch marka Pulverisette 6 model eksenel değirmende 300 devir/dakika hızla 45 dakika süreyle yaş öğütmeye tabi tutulmuştur. Öğütme sonrası 100°C'de 48 saat süreyle kurutma işlemi uygulanmıştır.

Bu çalışmada, açık gözenekli bir yapı elde etmek amacıyla Ürosan (İnegöl, Bursa) firmasından temin edilen 10, 20 ve 30 ppi polimerik sünger malzemeleri kullanılmıştır. Gözenekli doku iskelesi üretim sürecinde izlenen temel basamaklar Şekil 1'de özetlenmektedir.



**Şekil 1.** Polimerik sünger yöntemiyle doku iskelesi üretimi akım şeması.

Sulu sistemde çamur hazırlama sürecinde hidroksiapatit ve çinko asetatın yanısıra reolojik özelliklerin düzenlenmesini sağlamak için Dolapix CE64 ve CMC gibi farklı reolojik ilaveler kullanılmıştır. Çamur hazırlama işlemi Fritsch marka Pulverisette 6 model eksenel değirmende 300 devir/dakika hızla 45 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Çamur bileşiminde kullanılan hidroksiapatit:çinko asetat oranı 20:3 olacak şekilde belirlenmiştir. Süngerler çamurla istenen ölçüde kaplandıktan sonra oda sıcaklığında 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Ardından da bağlayıcı giderme ve sinterleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Sinterleme işlemi 1150°C ve 1200°C'de 90 dakika süreyle atmosfer koşullarında kutu tipi fırında gerçekleştirilmiştir.

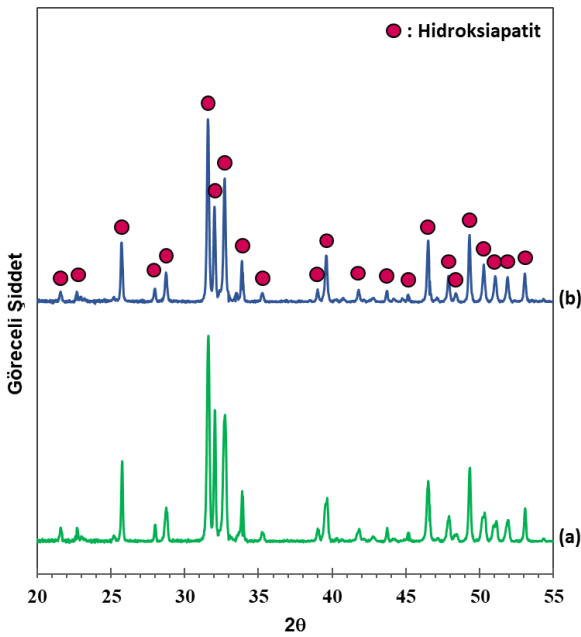
Sığır kemiklerinden sentezlenen seramiğin faz analizi Bruker marka D8 model X-ışını kırınım (XRD) cihazı ile Cu-K $\alpha$  radyasyonu ( $\lambda=1.5406\text{\AA}$ ) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretilen doku iskelelerinin morfoloji, tane boyutu ve EDX ile elementel kimyasal bileşimi ise Carl Zeiss/Gemini 300 taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. UV incelemeleri Shimadzu-UV 3800 marka UV-VIS-NIR cihazında 200 nm-2500 nm dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Her bir ölçüm üç kez tekrar edilmiştir. Malzemelerin IR spektrumu Thermo Nicolet iS50 model ATR-FTIR spektrofotometresi kullanılarak elde edilmiştir. ATR kristali üzerine yerleştirilen numunelerin tam olarak temas etmesi sağlandıktan sonra 4000-400 cm $^{-1}$  dalga boyu aralığında ve 4 cm $^{-1}$  çözünürlükte analizler gerçekleştirilmiştir. Her bir ölçüm üç kez tekrar edilmiştir.

Üretilen hidroksiapatit ve çinko katkılı hidroksiapatit seramiklerinin patojen bakteriler olan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) bakterilerine karşı etkinlikleri test edilmiştir. İki mg ağırlığında tartılan her bir toz (hidroksiapatit ve çinko asetat katkılı hidroksiapatit) otoklavda sterilize edildikten sonra üzerine 1 ml 107 kob/ml yoğunluktaki bakteri kültürlerinden eklenmiş ve 6 saat süreyle 37°C, 250 rpm'de inkübe edilmiştir. İçerisine numune eklenmeyen 1 ml bakteri kültürü de aynı şekilde inkübe edilmiş ve kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda sıvı kültürlerden 100  $\mu$ l alınarak Nutrient Agar üzerine yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan plaklar 16 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra plaklardaki bakteri yoğunluğu kontrol plaklarındakiyle karşılaştırılarak üretilen tozların antibakteriyel etkinlikleri değerlendirilmiştir.

### 3. Bulgular

Sığır kemiklerinin 850° ve 950°C'de 3 saat süreyle kalsinasyonu ile sentezlenen seramik numunelerin

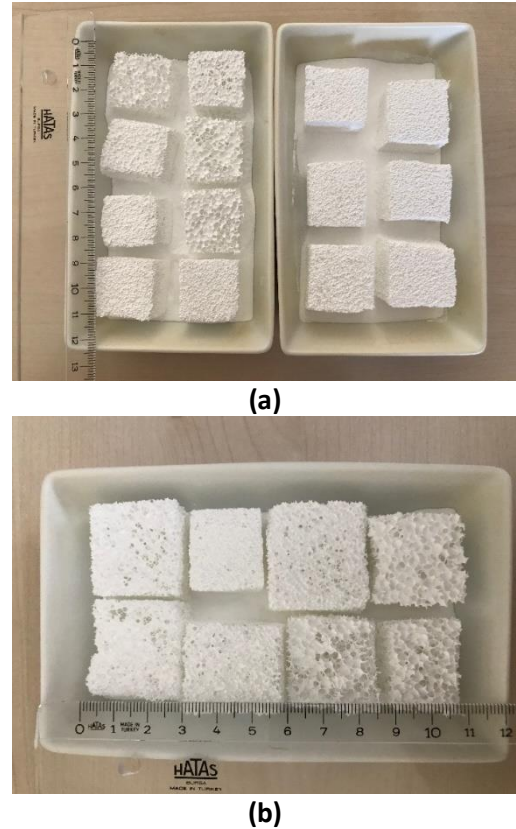
agat havanda öğütüldükten sonra gerçekleştirilen XRD analizi sentezlenen tozların faz bileşiminin aynı olduğunu ve yapıda sadece hidroksiapatit fazının (JCPDS 9–432) bulunduğunu göstermiştir (Şekil 2). Çekimlerde gürültü oranının düşük olduğu ve elde edilen piklerin oldukça keskin olduğu gözlemlenmiştir. Ramesh ve ark. (Ramesh et al., 2018) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada siğır kemikleri 600–1000°C’de 2 saat süreyle kalsine edilmiş ve bu çalışmada elde edilmiş olan faz içeriğine benzer şekilde sadece hidroksiapatit fazı elde edildiği bildirilmiştir. Siğır kemiklerinden elde edilen hidroksiapatit fazının da söz konusu kalsinasyon sıcaklık aralığında kararlı olduğu belirlenmiştir (Ramesh et al., 2018). Kalsinasyon sıcaklığı 1000°C’ye çıkarıldığında dahi hidroksiapatit fazının herhangi bir bozunmaya uğramadığı belirlenmiştir. Ayrıca artan kalsinasyon sıcaklığına bağlı olarak, özellikle 600°C’den 750°C’ye çıkıldığında kristallenme oranının da belirgin bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Ramesh et al., 2018). Bano ve ark. (Bano, Jikan, Basri, Adzila, & Zago, 2019) da siğır kemiklerini 600–1000°C’de 3 saat süreyle kalsine etmiş ve benzer şekilde kalsinasyon sonrası yapıda sadece hidroksiapatit fazının bulunduğunu bildirmişlerdir.



**Şekil 2.** Siğır kemiklerinin (a) 850° ve (b) 950°C’de 3 saat süreyle kalsinasyonu sonucunda sentezlenen biyoseramiklere ait XRD analiz sonucu.

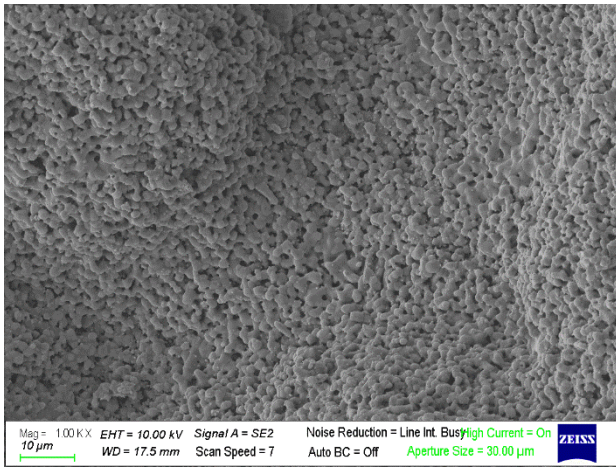
Ramesh ve ark. (Ramesh et al., 2018) tarafından gerçekleştirilen çalışmada elde edilen hidroksiapatit tane boyutunun bu çalışmada elde edilen tane boyutlarıyla benzer olduğu saptanmıştır.

Polimerik sünger yöntemiyle hazırlanan ve farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş olan hidroksiapatit doku iskelelerine ait görsel Şekil 3’de sunulmaktadır.

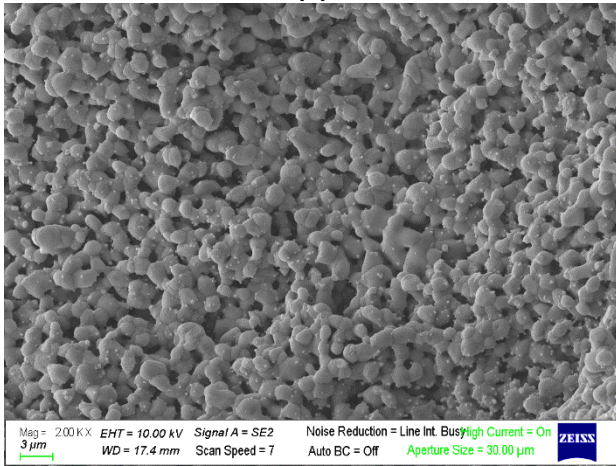


**Şekil 3.** Polimerik sünger yöntemiyle hazırlanan ve (a) 1200°C’de ve (b) 1150°C’de 1,5 saat süreyle sinterlenmiş olan çinko katkılı hidroksiapatit doku iskeleleri.

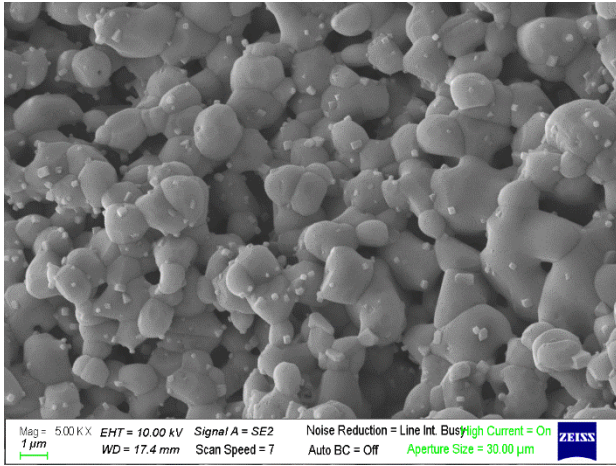
Çinko katkılı hidroksiapatit doku iskelelerinin 1200°C’de 1,5 saat süreyle sinterlenmesi sonrasında kırık yüzeyleri SEM ile incelendiğinde oldukça homojen bir içyapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4). Yapıda gözenek dağılımı, tane boyutu ve dağılımının oldukça homojen olduğu belirlenmiştir. Süngerlerin kendi büyük gözenekleri milimetre boyutlarında makro gözenekler oluşmasını sağlarken, hücre duvarlarında taneler arasında ise mikron metre boyutlarında gözenekler oluşmuştur (Şekil 4).



(a)



(b)

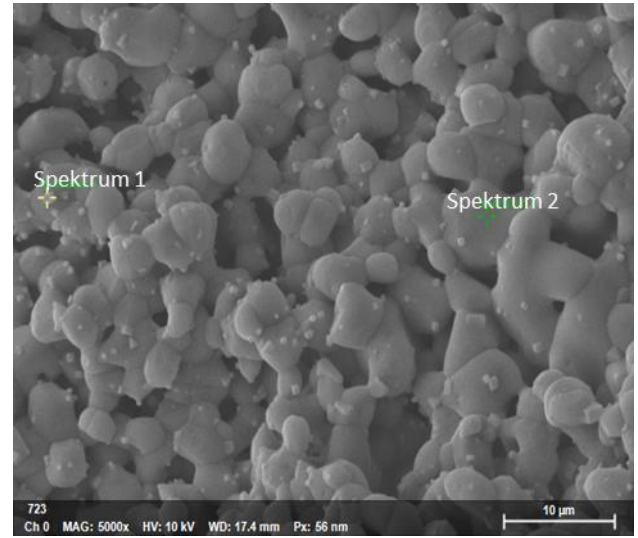


(c)

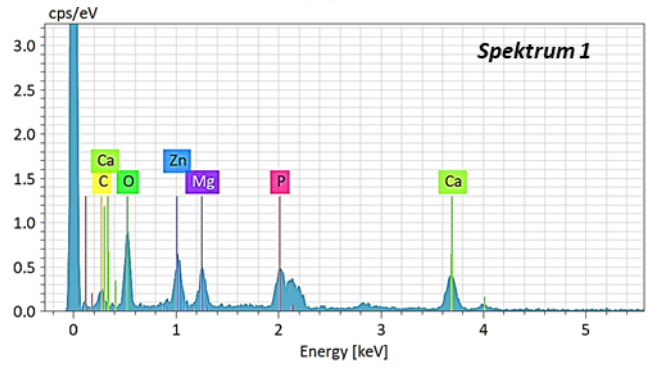
**Şekil 4.** Polimerik sünger yöntemiyle hazırlanan ve 1200°C’de 1,5 saat süreyle sinterlenmiş olan çinko katkılı hidroksiapatit doku iskelesine ait (a) 1 kX, (b) 2 kX ve (c) 5 kX büyütmelerde kırık yüzey SEM görüntüleri.

İçyapı analizi gerçekleştirilen numuneden iki farklı bölgeden EDX analizi alınmıştır. Büyük tanelerin üzerine çökelmiş olan küçük tanelerin çinko içerdiği belirlenmiştir (Şekil 5). Hidroksiapatit tanelerinden

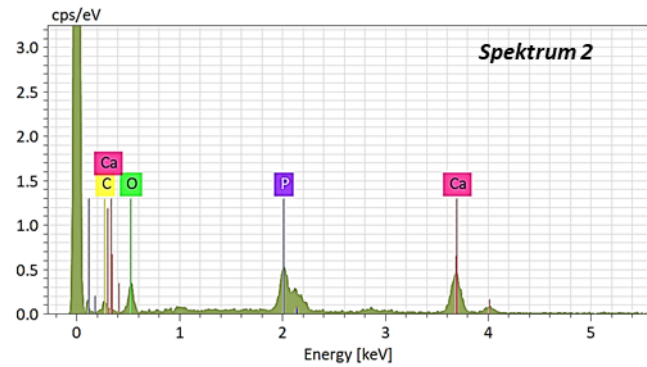
alınan EDX spektrumunda ise Zn pikinin çok düşük olduğu belirlenmiştir. (Şekil 5)



(a)



(b)



(c)

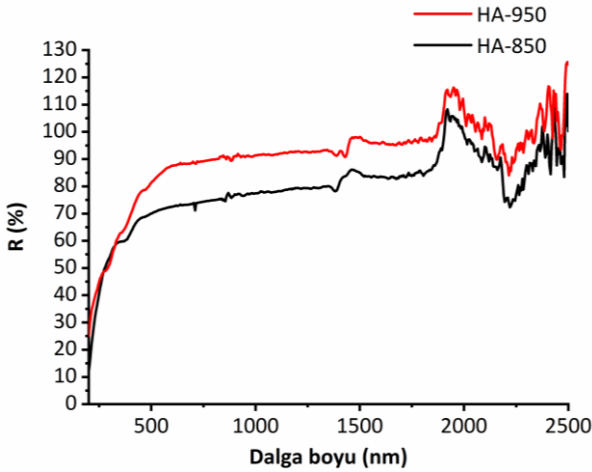
Spectrum	Carbon	Oxygen	Magnesium	Phosphorus	Calcium	Zinc
Spektrum 1	7.63	40.21	4.19	5.67	29.81	12.49
Spektrum 2	4.07	29.38		12.48	54.07	

(d)

**Şekil 5.** Numunelerden 1200°C’de sinterlenmiş olan çinko katkılı hidroksiapatit doku iskelesinde iki farklı bölgeden alınan EDX analiz sonuçları. (a) EDX alınan iki noktayı gösteren SEM görüntüsü, (b) 1 numaralı noktaya ait EDX spektrumu, (c) 2 numaralı noktaya ait EDX spektrumu ve (d) 1 ve 2 numaralı

noktalardan alınan EDX analizleriyle belirlenen ağırlıkça % elementel bileşim.

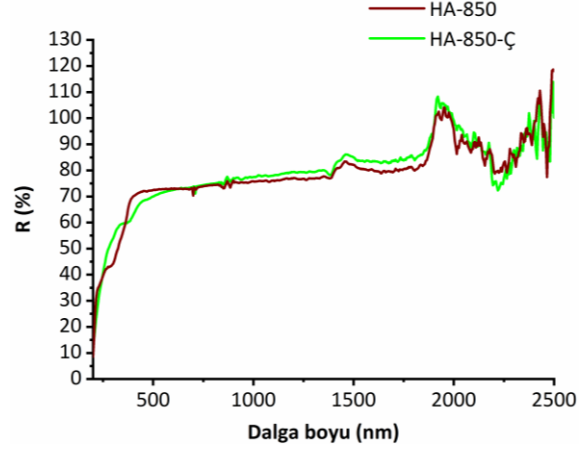
Şekil 6'da farklı kalsinasyon sıcaklıklarında sentezlenen hidroksiapatitin % yansıtıcılık değerleri sunulmaktadır. HA-850 numunesi (850°C'de, 3 saat sürede sentezlenen hidroksiapatit), görünür bölgede yaklaşık %70 yansıtıcılık ve IR bölgede ise maksimum %113 yansıtıcılık değerine sahiptir. HA-950 (950°C'de, 3 saat sürede sentezlenen hidroksiapatit) numunesi ise görünür bölgede maksimum %90 civarında ve IR bölgede ise %127 yansıtıcılık değerine sahiptir. Kısa dalga boylarında numuneler yüksek oranda ışığı absorpladıkları için yansıtma (reflektans) değerleri düşmektedir. Numunelerin her ikisi de 1800–2500 nm dalga boyu bandında siyah cisim gibi davranarak IR bölgede ışığı absorplayarak önce bir enerji oluşmakta ve ardından bu enerjiyi yayarak yansıtma değeri tekrar artış göstererek %100'ün üzerine çıkmaktadır. (Yildirim, Kanber, Karahan, & Karahan, 2018)



**Şekil 6.** 850° ve 950°C'de, 3 saat sürede sentezlenen hidroksiapatitlere ait % yansıtıcılık değerleri.

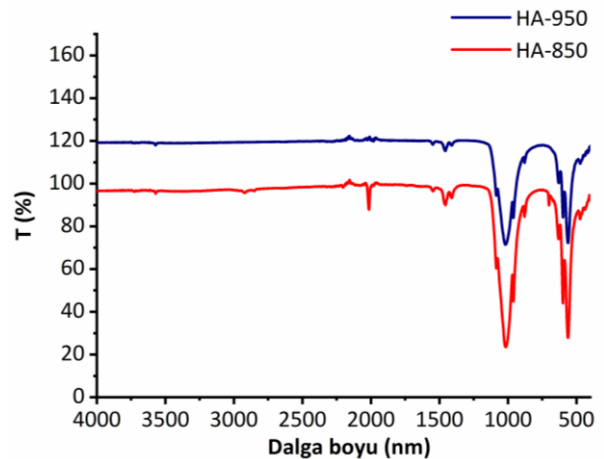
Şekil 7'de HA-850 ve HA-850-Ç (850°C'de sentezlenen hidroksiapatite çinko asetat katkısı ile hazırlanan ve 1200°C'de sinterlenen numune) numunelerine ait % yansıtma değerleri görülmektedir. Buna göre her iki numune de görünür bölgede yaklaşık %70 yansıtıcılık ve IR bölgede ise maksimum %113 yansıtıcılık değerine sahiptir. Numunelerden HA-850-Ç ise IR bölgede maksimum %128 yansıtıcılık değerine sahiptir.

Numunelerin her ikisi de 1800–2500 nm dalga boyu bandında siyah cisim gibi davranarak IR bölgede ışığı absorplayarak önce bir enerji oluşmakta ve ardından bu enerjiyi yayarak yansıtma değeri tekrar artış göstererek %100'ün üzerine çıkmaktadır.(Yildirim et al., 2018)



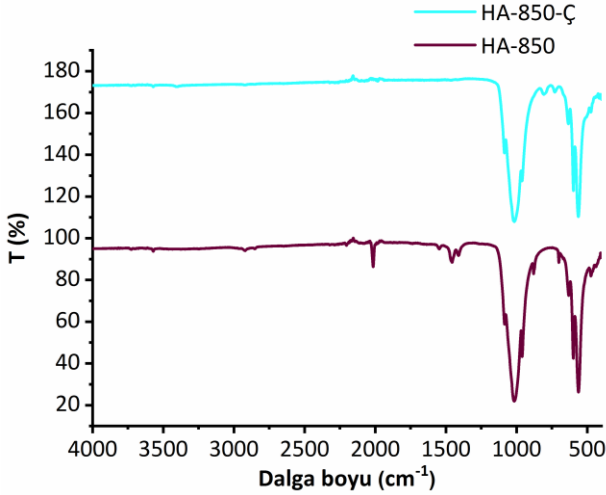
**Şekil 7.** HA-850 ve HA-850-Ç (850°C'de sentezlenen hidroksiapatite çinko asetat katkısı ile hazırlanan ve 1200°C'de sinterlenen numune) numunelerine ait % yansıtma değerleri.

Şekil 8'de FTIR spektrumları incelendiğinde, her iki malzemede de 3200–3500  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyları arasında görülen pik hidroksiapatit yapısında bulunan  $\text{OH}^-$  grubuna aittir.  $(\text{PO}_4)^{3-}$  grubunun ana ve en belirgin karakteristik genişleme piki tüm analizlerde 1085 ve 1015  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyları arasında görülmektedir. 561  $\text{cm}^{-1}$  ve 598  $\text{cm}^{-1}$  değerlerinde görülen pikler  $(\text{PO}_4)^{3-}$  ün asimetrik bükülme pikidir. Hidroksiapatitin bu karakteristik piklerine ek olarak 2014  $\text{cm}^{-1}$ , 1456  $\text{cm}^{-1}$  ve 1400  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyundaki pikler  $(\text{CO}_3)^{2-}$  grubuna ait olan asimetrik gerilme pikidir. 879  $\text{cm}^{-1}$  pik ise  $(\text{CO}_3)^{2-}$  grubunun bükülme pikidir. 950 derecedeki HA e ait pik şiddetlerinde azalma görülmektedir.



**Şekil 8.** 850° (HA–850) ve 950°C’de (HA–950), 3 saat sürede sentezlenen hidroksiapatit toz numunelere ait FTIR spektrumları.

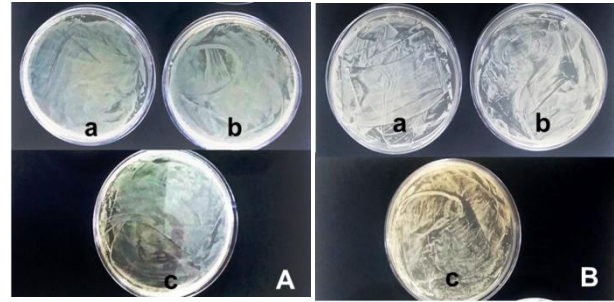
Şekil 9’de HA–850 ve HA–850–Ç numunelerine ait FTIR spektrumları sunulmaktadır. Bu spektrumlarda 2014 cm<sup>-1</sup>, 1456 cm<sup>-1</sup> ve 1400 cm<sup>-1</sup> dalga boyundaki pikler (CO<sub>3</sub>)<sup>-2</sup> grubuna ait olan asimetrik gerilme pikleridir. Çinko asetatı ise (CO<sub>3</sub>)<sup>-2</sup> grubuna ait bu pikler kaybolmaktadır.



**Şekil 9.** HA–850 ve HA–850–Ç (850°C’de sentezlenen hidroksiapatite çinko asetat katkısı ile hazırlanan ve 1200°C’de sinterlenen numune) numunelerine ait FTIR spektrumları.

Hidroksiapatit ve çinko katkılı hidroksiapatitin *S. aureus* ve *E. coli*’ye karşı antibakteriyel aktivitesi Şekil 10’da gösterilmektedir. Hidroksiapatit eklenmemiş olan bakteri kültürü ile inoküle edilen kontrol plaklarındaki bakteri yoğunluğunun, hidroksiapatit ve çinko katkılı hidroksiapatit içeren bakteri kültürü ile inoküle edilen plaklardakine benzer olduğu görülmüştür. Bu durum 2 mg/ml yoğunluğundaki hidroksiapatitin test bakterilerine karşı herhangi bir inhibe edici etkisinin olmadığını göstermektedir. Seyedmajidi ve arkadaşları (Seyedmajidi, Rajabnia, Seyedmajidi, 2018) da bu çalışmadakine benzer şekilde ürettikleri hidroksiapatit/biyoaktif cam nanokompozitlerinin *S. aureus* ve *Enterococcus faecalis*’e karşı herhangi bir antibakteriyel etki göstermediğini ortaya koymuşlardır. Ofudje ve arkadaşları (Ofudje, Adeogun, Idowu, & Kareem, 2019) da ürettikleri hidroksiapatitin *S. aureus* ve *E. coli*’ye karşı

antibakteriyel aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada kullanılan çinko katkılı hidroksiapatitin, çinkonun antibakteriyel özelliğinden dolayı bakteri gelişimi inhibe etmesi beklenirken böyle bir etki gözlenmemiştir. Ofudje ve ark. (Ofudje et al., 2019) çinko dopladıkları hidroksiapatitin antibakteriyel aktivitesinin artan çinko miktarına bağlı olarak artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durum bu çalışmada hidroksiapatite ilave edilen çinko oranının düşük kaldığını ve istenen düzeyde antibakteriyel etki gözlenebilmesi için daha yüksek oranda çinko ilave edilmesi gerektiğini göstermektedir.



**Şekil 10.** Hidroksiapatit ve çinko katkılı hidroksiapatitin *E.coli* (A) ve *S. aureus*’a (B) karşı antibakteriyel aktivitesi (a) hidroksiapatit, (b) çinko katkılı hidroksiapatit ve (c) kontrol.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

- Konya’da yerel bir işletmeden temin edilen siğır kemiklerinin 850° ve 950°C’de 3 saat süreyle kalsinasyonu sonucunda başarılı bir şekilde hidroksiapatit biyoseramiğinin elde edildiği gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarıyla belirlenmiştir. Literatürde siğır kemiklerinin 600–1000°C aralığında 2–3 saat süreyle kalsinasyonu gerçekleştirildikten sonra yapıda sadece kararlı hidroksiapatit fazının bulunduğu bildirilmektedir (Bano et al., 2019; Ramesh et al., 2018). Bu çalışmada literatürle uyumlu bir şekilde kalsinasyon sonrası yapıda sadece hidroksiapatit fazının bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen hidroksiapatit tane boyularının da literatürde mevcut çalışmalarla benzer olduğu belirlenmiştir.

- Sentezlenen hidroksiapatit ile yüksek gözenek oranına sahip, oldukça hafif doku iskeleleri polimerik sünger yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda 10, 20 ve 30 ppi polimerik süngerler kullanılmıştır. Sinterleme çalışmaları 1150° ve 1200°C'de 1,5 saat süreyle başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve açık gözenekli yapının sinterleme sürecinde çökmeden formunu koruduğu belirlenmiştir. Polimerik sünger yöntemi pek çok farklı gözenekli seramiklerin üretiminde en yaygın şekilde kullanılan yöntemlerden biridir (Jo et al., 2009; Kalemtaş et al., 2018; Lett, Sundareswari, Ravichandran, & Sagadevan, 2018; Ramay & Zhang, 2003).
- Hazırlanan doku iskelesinin 1200°C'de sinterlenmesi sonucunda elde edilen yapının oldukça homojen bir mikroyapıya ve nispeten dar bir tane boyut dağılımına (~1–3 µm) sahip olduğu belirlenmiştir.
- Yapılan bu çalışmada kullanılan çinko katkılı hidroksiapatitin, çinkonun antibakteriyel özelliğinden dolayı bakteri gelişimi inhibe etmesi beklenirken böyle bir etki gözlenmemiştir. Bu çalışmada tek bir çinko oranında çalışma yapılmıştır. İlerleyen çalışmalarda daha yüksek oranlarda çinko ilaveleriyle çalışmalar devam ettirilecektir.
- Bu çalışma disiplinlerarası bir grup tarafından başlatılan deneysel çalışmaların ilk sonuçlarını içermektedir. Çalışmanın devamında üretilen doku iskelelerinin üretim koşulları ve bileşimlerinin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra mekanik özellikleri ile sitotoksitesite ve antibakteriyel incelemeleri gerçekleştirilecektir.

### Teşekkür

Bu çalışma kapsamında kullanılan seramik altlıklar Portland Porselen (Bilecik) firması tarafından ve kullanılan Dolapix CE-64 deflokülantı ise Zschimmer & Schwarz, Lahnstein, Almanya firması tarafından sağlanmıştır. Kendilerine değerli katkıları için teşekkür ederiz. SEM ve XRD analizleri Bursa Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Verdikleri destek için merkez yönetim ve uzmanlarına teşekkür ederiz.

### Kaynaklar

- Abdulrahman, I., Tijani, H. I., Mohammed, B. A., Saidu, H., Yusuf, H., Ndejiko Jibrin, M., & Mohammed, S. 2014. From garbage to biomaterials: An overview on egg shell based hydroxyapatite. *Journal of Materials*, 2014.
- Bano, N., Jikan, S. S., Basri, H., Adzila, S., & Zago, D. M. 2019. *XRD and FTIR study of A&B type carbonated hydroxyapatite extracted from bovine bone*. Paper presented at the AIP Conference Proceedings.
- Callan, D. P., & Rohrer, M. D. 1993. Use of bovine-derived hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. *Journal of periodontology*, 64(6): 575-582.
- Gergely, G., Wéber, F., Lukács, I., Tóth, A. L., Horváth, Z. E., Mihály, J., & Balázs, C. 2010. Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell. *Ceramics International*, 36(2): 803-806.
- Hammel, E., Ighodaro, O.-R., & Okoli, O. 2014. Processing and properties of advanced porous ceramics: An application based review. *Ceramics International*, 40(10): 15351-15370.
- Huang, Y.-C., Hsiao, P.-C., & Chai, H.-J. 2011. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. *Ceramics International*, 37(6): 1825-1831.
- Jang, H., & Kang, S.-H. 2002. Phosphorus removal using cow bone in hydroxyapatite crystallization. *Water research*, 36(5): 1324-1330.
- Jo, I.-H., Shin, K.-H., Soon, Y.-M., Koh, Y.-H., Lee, J.-H., & Kim, H.-E. 2009. Highly porous hydroxyapatite scaffolds with elongated pores using stretched polymeric sponges as novel template. *Materials Letters*, 63(20): 1702-1704.
- Kalemtaş, A., Topates, G., Özcoban, H., Mandal, H., Kara, F., & Janssen, R. 2013. Mechanical characterization of highly porous  $\beta$ -Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> ceramics fabricated via partial sintering & starch addition. *Journal of the European Ceramic Society*, 33(9): 1507-1515.
- Kalemtaş, A., Özey, N., & Aydın, M. T. A. 2018. Processing of layered porous mullite ceramics. *Journal of the Australian Ceramic Society*, 54(3): 545-555.
- Karl, S., & Somers, A. V. 1963. Method of making porous ceramic articles: Google Patents.



- Koutsopoulos, S. 2002. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. ***Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials***, 62(4): 600-612.
- Lett, J. A., Sundareswari, M., Ravichandran, K., & Sagadevan, S. 2018. THE FABRICATION OF POROUS HYDROXYAPATITE SCAFFOLD USING GAUR GUM AS A NATURAL BINDER. ***Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)***, 13(1).
- Ofudje, E. A., Adeogun, A. I., Idowu, M. A., & Kareem, S. O. 2019. Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies. ***Heliyon***, 5(5): e01716.
- Oliveira, D., Benelli, P., & Amante, E. 2013. A literature review on adding value to solid residues: egg shells. ***Journal of Cleaner Production***, 46: 42-47.
- Ong, J. L., & Chan, D. C. 2000. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review. ***Critical Reviews™ in Biomedical Engineering***, 28(5&6).
- Ooi, C., Hamdi, M., & Ramesh, S. 2007. Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone. ***Ceramics international***, 33(7): 1171-1177.
- Ozawa, M., & Suzuki, S. 2002. Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment. ***Journal of the American Ceramic Society***, 85(5): 1315-1317.
- 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.
- Ramesh, S., Loo, Z. Z., Tan, C. Y., Chew, W. K., Ching, Y. C., Tarlochan, F., Chandran, H., Krishnasamy, S., Bang, L. T., & Sarhan, A. A. 2018. Characterization of biogenic hydroxyapatite derived from animal bones for biomedical applications. ***Ceramics International***, 44(9): 10525-10530.
- Ripamonti, U., Crooks, J., Khoali, L., & Roden, L. 2009. The induction of bone formation by coral-derived calcium carbonate/hydroxyapatite constructs. ***Biomaterials***, 30(7): 1428-1439.
- Roy, D. M., & Linnehan, S. K. 1974. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. ***Nature***, 247(5438): 220.
- Rujitanapanich, S., Kumpapan, P., & Wanjanoi, P. 2014. Synthesis of hydroxyapatite from oyster shell via precipitation. ***Energy Procedia***, 56: 112-117.
- Sivakumar, M., Kumar, T. S., Shantha, K., & Rao, K. P. 1996. Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. ***Biomaterials***, 17(17): 1709-1714.
- Studart, A. R., Gonzenbach, U. T., Tervoort, E., & Gauckler, L. J. 2006. Processing routes to macroporous ceramics: a review. ***Journal of the American Ceramic Society***, 89(6): 1771-1789.
- Terzioğlu, P., Ögüt, H., & Kalemtaş, A. 2018. Natural calcium phosphates from fish bones and their potential biomedical applications. ***Materials Science and Engineering: C***.
- Venkatesan, J., & Kim, S.-K. 2014. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering—a review. ***Journal of biomedical nanotechnology***, 10(10): 3124-3140.
- Wu, S.-C., Hsu, H.-C., Hsu, S.-K., Tseng, C.-P., & Ho, W.-F. 2019. Effects of calcination on synthesis of hydroxyapatite derived from oyster shell powders. ***Journal of the Australian Ceramic Society***: 1-8.
- Wu, S.-C., Hsu, H.-C., Wu, Y.-N., & Ho, W.-F. 2011. Hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders by ball milling and heat treatment. ***Materials characterization***, 62(12): 1180-1187.
- Yildirim, K., Kanber, A., Karahan, M., & Karahan, N. 2018. The solar properties of fabrics produced using different weft yarns. ***Textile Research Journal***, 88(13): 1543-1558.
- Zakaria, S. M., Sharif Zein, S. H., Othman, M. R., Yang, F., & Jansen, J. A. 2013. Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: a review. ***Tissue Engineering Part B: Reviews***, 19(5): 431-441.