

## İPEK-FİBROİN-CA-P KOMPOZİT KEMİK REPLASMAN BİYOMALZEMESİ GELİŞTİRİLMESİ

K. Basaran<sup>1</sup>, Y. Sunar<sup>2</sup>, H. Celebioglu<sup>2</sup>, F.S. Utku<sup>1</sup>

Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Yeditepe Üniversitesi, Kayışdağı Caddesi,  
34755 Ataşehir, İstanbul, Türkiye

Emails: [k.bsrn@hotmail.com](mailto:k.bsrn@hotmail.com), [sermin.utku@yeditepe.edu.tr](mailto:sermin.utku@yeditepe.edu.tr),  
web page: <http://bme.yeditepe.edu.tr/Faculty/>

Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Çorlu Mühendislik Fakültesi, Namık Kemal Üniversitesi  
Çorlu, Tekirdağ, Türkiye

Emails: [sunaryagmur00@hotmail.com](mailto:sunaryagmur00@hotmail.com), [celebioglu\\_hulya@hotmail.com](mailto:celebioglu_hulya@hotmail.com)

### ÖZET

Mineralize doğal protein malzemeler kemik replasman malzemeleri ve doku mühendisliğinde kullanılacak yeni malzemeler olarak araştırılmaktadır. İpek fibroin elyaftan oluşturulan süngerler ve filmler eşsiz biyoyumlulukları sebebiyle mineralize kompozitler olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, düzenli yönlendirilmiş ipek fibroin iskelelerin biomimetik mineralizasyonu incelenmiştir. Saf ipek fibroin kumaş 20 dakika boyunca 0.02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> içerisinde kaynatılmıştır. Kalsiyum fosfat oluşumu, ardışık daldırma yöntemiyle, 7.4 pH'da tamponlanmış 0.15 M NaCl ve 50mM TRIS-HCl içeren 250 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O ve 120 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltilerinde, ardışık olarak yedişer kez 20 dakika boyunca daldırılarak, 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Örneklerin üzerindeki Ca-P oluşumu daldırma adımlarının sayısıyla artmıştır. Ca-P tabakasının XRD analizi de, 11.76 2θ'deki karakteristik pik bruşit oluşumunu göstermiştir. SEM görüntüleme, altınla kaplanan örnekler üzerindeki bruşit oluşumunun 120 dakika boyunca -20mA/cm<sup>2</sup> sabit katodik akımda 40°C'deki konsantrasyonlu SBF solüsyonu içinde gerçekleştirilen elektrokimyasal hidrotermal uygulaması sonrasında amorf kalsiyum fosfat ile birlikte hidroksiapatit oluşumu XRD ve SEM analizleriyle gösterilmiştir. İpek - hidroksiapatit kompozit yapıdaki malzeme, yönlendirilmiş hücre büyümesi için ihtiyaç duyulan ve kemik replasman ameliyatlarında uygulanabilecek ucuz, biyoyumlu ksenogreft olarak kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** ipek iskele, hidroksiapatit, kompozit malzeme, doku mühendisliği, kemik replasman malzemeleri.

### ABSTRACT

Mineralized natural protein based materials are investigated as novel materials to be used in tissue engineering and as bone replacement materials. Silk fibroin fiber based foams and films are used as mineralized composites due to their excellent biocompatibility. In this study, the biomimetic mineralization of orderly oriented fibrous silk based scaffolds was studied. Commercially obtained pure silk woven fabric was boiled in 0.02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> for 20 min. The deposition of calcium phosphate was conducted at

37°C for twenty minutes in seven sequential immersion steps in 250 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O and 120 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, both containing 0.15 M NaCl and 50mM solution of TRIS-HCl, buffered at 7.4. Ca-P deposit on the samples increased with the number of immersion steps. The analysis of the Ca-P powder deposit indicated formation of brushite with its characteristic peak at around 11.76 2θ using the XRD analysis. Samples were sputter coated with gold for SEM characterization. The morphology of the Ca-P deposits confirmed formation of brushite crystals, on which then HA was deposited in concentrated SBF solution at 40°C, using electrochemical hydrothermal treatment at a current density of -20mA/cm<sup>2</sup> for 120 min. using XRD and SEM analysis. The silk-HA composite material may be an inexpensive promising biocompatible graft material to be used in bone replacement surgery, where highly oriented materials for guided cell growth may be needed.

**Keywords:** silk scaffold, hydroxyapatite, composite materials, tissue engineering, bone replacement materials.

### 1. GİRİŞ

Canlıların hareketliliğini, boyunu, iç organlarının korunmasını, kan hücresi oluşumunu sağlayan kemikler, kalsiyum, magnezyum ve fosfat iyonları deposudur [1]. Kemikler hidroksiapatit (HA), Tip 1 kollajen, proteoglikanların ve suyun hiyerarşik yapılanmasından oluşan bir malzemedir [2]. Çeşitli biyomimetik çalışmalarda osteoprogenitor hücrelerin tutunmasını ve gelişimini mümkün kılan kalsiyum fosfat (Ca-P) osteokondüktif nanoyapı içeren doğal dokulara benzer yapıları yapay olarak üretimini denemiştir [3,4]. Bununla birlikte, Ca-P biyomalzemeler kemiğin yenilenmesi için yeterli olmayabilir; bu nedenle, otogreft, allogreft, ksenogreft malzemelere ilaveten, alloplastik ve yapay malzemeler [5], metal implantlar [6] kemik kırığının ve eklemlerin tedavisinde kullanılabilir. Kompozit yapay kemik yenileme ajanlarına yani polimerik ve seramik kompozit malzemelere ihtiyaç vardır [7].

## Biyomalzeme

2. Gün / 16 Ekim 2015, Cuma

Yeterli gözenek büyüklüğüne ve toplam gözenekliliğe sahip osteokondüktif iskele hem hücrelerin tutunmasını, hem de besin ve metabolitlerin kolaylıkla kullanımını sağlar [8]. Sıklıkla kullanılan biyolojik olarak çözünebilen polimerlerden poliglaktik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), birleşik çoklu polimerler poli\_DL-laktik-glikolik asite (PLGA) ilaveten, doğal olarak elde edilen, biyobozunan kollajen, fibrin [9] ve ipek [10] polimerler bulunmaktadır. İpek protein, düşük bozunma özelliği, çapraz bağlarla sağlanmayan kimyasal kararlılığı ve homojen hücre büyümesini sağlayan bağlantılı gözenekliliğiyle tercih sebebidir [11]. İyileştirilmiş mekanik ve biyobozunma özellikleri, biyouyumluluğuyla ipek-temelli malzemeler biyomedikal uygulamalarda geniş uygulama olanağına sahip olabilirler [12-14]. Buna ilaveten, ipek yüksek sıcaklık ve ağır koşullara dayanıklı bir malzemedir.

Üç boyutlu gözenekli ipek fibroin iskelelerin mekanik özellikleri, gözeneklilikleri ve gözenek büyüklükleri, ipek-fibroin proteininin ve porojenin konsantrasyonunu module ederek hazırlanabilir [15]. İpek-fibroinden elde edilen kemik yenileme malzemelerinin osteoindüktif etkisi, biyobenzetim yoluyla, malzeme üzerinde HA oluşumuyla geliştirilebilir [16,17]. Fizyolojik koşullar altında doğal elyaf üzerinde HA oluşumu pahalı polihidroksiasitlerin kullanımını gerektirdiğinden [19-21] göreceli olarak zor olabilir [18,22].

Bu çalışmada, elektrokimyasal yöntemler kullanılarak karbonatlı hidroksiapatit (CHA) oluşumunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır [18,22]. Yöntem, polihidroksiasitler ve büyüme faktörü kullanmadan CHA oluşumunu sağlayacak pratik ve ekonomik bir alternatif sunmaktadır. Gözenekli biyobozunan ipek fibroin iskelelere biyolojik HA'ın elektrokimyasal olarak çöktürülmesiyle osteoindüktif çıktılarda iyileşme beklenmektedir.

## 2. ARAÇ VE YÖNTEMLER

### 2.1. İpek iskelenin karakterize edilmesi ve hazırlanması:

Saf ipek kumaş malzeme yüzeyindeki boya ve apreği gidermek amacıyla 0.02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sulu çözeltisi içerisinde 20 dakika boyunca kaynatıldıktan sonra, distile su ile tamamen yıkandı ve Elektron Tarama Mikroskobu (FE-SEM) kullanılarak karakterize edildi.

### 2.2. İpek kumaş iskelenin döngüsel yöntemle mineralizasyonu:

İpek-fibroin iskele simüle edilmiş vücut sıvısı çözeltisinde (SBF) Kim et. al. [16] tarafından kullanılan yöntemle, farklı çözeltiler kullanılarak mineralize edildi. 5 adet 5×3 cm ebadındaki ipek

fibroin iskele, 37°C 'deki 20 ml.lik 250 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (0.15 M NaCl içeren, 50 mM TRIS·HCl ile pH 7.4'a tamponlanmış) çözeltisinde 20 dakika bekletildikten sonra 37°C'deki 20 ml.lik 120 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.15 M NaCl içeren, 50 mM TRIS·HCl ile pH 7.4'a tamponlanmış) çözeltisine aktarılarak 20 dakika boyunca bekletildi [16]. Bu işlem döngüsel olarak yedi kez tekrarlandı.

### 2.3. İpek kumaş iskelenin elektrokimyasal yöntemle mineralizasyonu:

Elektrokimyasal yöntemle hidroksiapatit oluşumu 3 elektrotlu elektrokimyasal hücre içerisinde gerçekleştirildi. Aktif elektrot titanyum, referans elektrot, standart gümüş/gümüş klorit elektrot (doymuş KCl içinde Ag/AgCl) ve karşıt elektrot da platin kaplamalı paslanmaz çelik elektroddu. Aktif elektrot 0.5M NaOH içinde 2 dakika boyunca 50°C 'de daldırma yöntemiyle biyoaktif edildi ve deiyonize suyla durulandı. Mineralize ipek fibroin örneği aktif elektrota sıkıca sarılarak birleştirildi. Elektrokimyasal yöntemle mineralizasyon, yukarıda verilen kalsiyum ve fosfat çözeltilerinin karışımını içeren SBF kullanılarak 40°C'de 120 dakika boyunca -20 mA/cm<sup>2</sup> sabit katot akım yoğunluğu sağlanarak gerçekleştirildi [18,22].

### 2.4. Mineral oluşumun karakterize edilmesi:

İpek kumaş iskelenin döngüsel ve elektrokimyasal yöntemlerle mineralizasyonundan sonra, açık havada kurutulmuş örneklerin üzerinde çöktürülmüş mineralin kristal özellikleri X-Işını Kırınım (XRD) ölçüm cihazı (Philips PW 3710) kullanılarak, 20-60° 2θ saçılma açısı aralığında, 0.2 2θ adım büyüklüğünde, 1° sıyırma açısında karakterize edildi. 1 mm kalınlığında dilimlere bölünmüş ipek iskeleler, üzerlerindeki mineral tabakasının yapı özelliklerinin inceleyebilmesi amacıyla altınla kaplanarak Elektron Tarama Mikroskobu (SEM) (Zeiss, Evo40) kullanılarak incelendi.

## 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

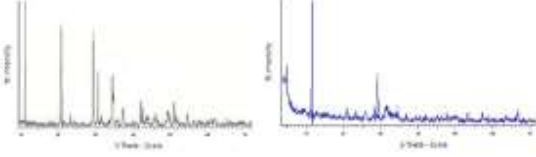
Ardışık döngüsel daldırma yöntemi kullanılarak elde edilen mineral tabakası, süreç sırasında çıplak gözle izlenebilmekteydi. Mineral tabakanın kalınlığı kalsiyum ve fosfat solüsyonları içinde her bir ardışık daldırma adımıyla birlikte arttı. Elle kolaylıkla dağılılabilen, beyaz toz halinde çökelti elde edildi.

### 3.1 Döngüsel yöntemle oluşturulan mineralin karakterizasyonu:

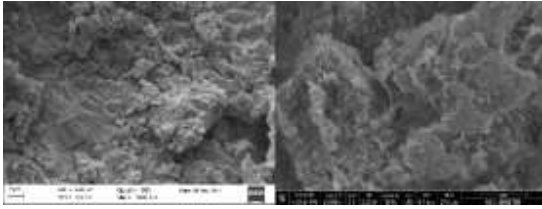
Örneklerin döngüsel yöntemle mineralizasyonu sonucunda elde edilen çökeltinin XRD analizi 10.76 2θ'da (Şkl. 1) belirgin olarak ayırt edilebilen pikle tanımlanabilen bruşit oluşumunu gösterdi. Mineral tabakasının SEM görüntüsünde gözlemlenen

## Biyomalzeme

monoklinik kristal yapı da XRD sonuçlarını doğruladı (Şkl. 2).



Şekil 1: İpek iskele üzerinde mineral oluşumunun XRD spektrumu. Elektrokimyasal oluşum sürecinden önce (solda) ve sonra (sağda).



Şekil 2: İpek iskele üzerinde mineral oluşumunun SEM görüntüleri. Elektrokimyasal çöktürme sürecinden önce (solda) ve sonra (sağda).

### 3.2 Elektrokimyasal yöntemle oluşturulan mineralin karakterizasyonu:

Örnekler üzerinde elektrokimyasal yöntemle çöktürülen mineral tabakasının XRD analizinde 32.18 2θ'da görülen ayırt edici pik (ICSD 00-019-0272) CHA oluşumuna işaret etti (Şkl. 1). Mineral tabakasının SEM görüntüleri amorf kalsiyum fosfat ve hidroksiapatit yapı özelliğinde kristallerin oluşumunu göstererek, XRD sonuçlarını doğruladı (Şkl. 2). Yükleme yapılacak malzemelerde kullanılan amorf, çözünürlüğü yüksek bir mineral olan brusit ipek-fibroin iskele üzerinde 37 °C'de oluştuğu gösterildi (Şkl. 2) [17].

### 3.3 Brusit elektrokimyasal yöntemle hidroksiapatite dönüşümü:

Elektrokimyasal katodik yöntem kullanılarak, elektron çıkışının sağlanmasıyla, hidrojen fosfat iyonları ve su, fosfat ve hidroksit iyonlarına indirgenmişinden, ipek-fibroin proteini üzerinde her iki bileşenin oluşumu ve dağılımı gösterildi (Şkl. 1 ve 2). XRD spektrumunda brusit oluşumuyla birlikte 31-34 2Theta arasında CHA'ye ait piklerin bulunması, iki saatlik kaplama sonucunda CHA'nin oluşmaya başladığını gösterdi. SEM görüntülerinde brusit, CHA'ye göre daha homojen dağılım gösterdi.

## 4. ÇIKARIMLAR

Ardışık dögüsel mineralizasyon yöntemi kullanılarak, ipek fibroin iskele üzerinde brusit oluştuğu ve elektrokimyasal çöktürme yöntemi kullanılarak 37°C'de fizyolojik pH'da CHA'ye dönüşmeye başladığı görülmüştür. Brusit, HA'ye göre suda kolay çözünen ve mekanik özellikleri

zayıf bir bileşik olduğundan, katodik elektrokimyasal çöktürme yöntemi kullanılarak CHA'ye dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu yöntemle, ipek-fibroin elyaf üzerinde CHA çöktürülerek biyomalzemenin kısa sürede, verimli ve etkili bir şekilde hazırlandığı gösterilmiştir.

## TEŞEKKÜRLER

Istanbul Teknik Üniversitesi, Malzeme ve Metalürji Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. Mustafa Urgen'e, Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden Prof. Dr. Mustafa Çulha'ya ölçüm ve bilimsel katkıları, Sevgin Turkeli, Zehra Yılmaz ve Kaan Tolga Cınıslı'ya Ca-P karakterizasyonundaki katkıları, Sinan Yağcıoğlu ve Betül Yardıbi'ne yayına hazırlanmasındaki katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## REFERANSLAR

- [1] J.D. Currey, *Bones: Structure and Mechanics*, Princeton University Press, Princeton, NJ, 2002.
- [2] F.S. Utku, M. Barak, E. Klein, CA. Yucesoy, H. Saybasili, S. Weiner, Probing the role of water in lamellar bone by dehydration in the Environmental Scanning Electron Microscope, *Journal of Structural Biology*, **162**, 2008, pp. 361-367.
- [3] F.S. Utku, E. Karaca, E. Seckin, G. Goller, M. Urgen, C. Tamerler, The effect of the topographical and chemical properties of titanium implants on osteoblasts, *Proceedings of the National Congress of Medical Technologies 2012, Antalya, Turkey, 2012*.
- [4] J.W.M. Vehof, J. Dolder, E. Ruijter, P.H.M. Spauwen, J.A. Jansen, Bone formation in CaP-coated and noncoated titanium fiber mesh, *J Biomed Mater Res*, **64A**, 2003, pp. 417-26.
- [5] G.J. Meijer, J.D. de Bruijn, R. Koole, C.A van Blitterswijk, Cell-based bone tissue engineering, *PLoS Med.*, **4**, 2007, pp. 260-264.
- [6] T. Kokubo, H.M. Kim, M. Kawashita, T. Nakamura, Bioactive metals: preparation and properties, *J. Mat. Sci. Mater. Med.* **15**, 2004, pp. 99-107.
- [7] R.Z. LeGeros, Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates, *Clin Orthop Relat Res*, **395**, 2002, pp. 81-98.
- [8] P.X. Ma, R. Zhang, G. Xiao, R. Franceschi, Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly( $\alpha$ -hydroxy acids)/hydroxyapatite composite scaffolds, *J Biomed Mater Res*, **54**, 2001, pp. 284-93.
- [9] L.B. Rocha, G. Goissis, M.A. Ross, Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing, *Biomaterials*, **23**, 2002, pp. 449-56.
- [10] U.J. Kim, J. Park, H.J. Kim, M. Wada, D.L. Kaplan, Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin, *Biomaterials*, **26**, 2005, pp. 2775-85.
- [11] Y. Wang, U-J. Kim, D.J. Blasioli, H.J. Kim, D.L. Kaplan, In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, **26**, 2005, pp. 7082-94.
- [12] S. Sofia, M.B. McCarthy, G. Gronowicz, D.L. Kaplan, Functionalized silk-based biomaterials for



**Biyomalzeme**

2. Gün / 16 Ekim 2015, Cuma

- bone formation, *J Biomed Mater Res.* **54**, 2001, pp. 139–48.
- [13] G.H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, **24**, 2003, pp. 401–16.
- [14] B. Panilaitis, G.H. Altman, J. Chen, H.J. Jin, V. Karageorgiou, D.L. Kaplan, Macrophage responses to silk, *Biomaterials*, **24**, 2003, pp. 3079–85.
- [15] R. Nazarov, H.J. Jin, D.L. Kaplan, Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin, *Biomacromolecules*, **5**, 2004, pp. 718–26.
- [16] H.J. Kim, U-J. Kim, H.S. Kim, C. Li, M. Wadag, G.G. Leisk, D.L. Kaplan, Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds, *Bone*, **42**, 2008, pp. 1226–1234.
- [17] R.R. Kumar, M. Wang, Biomimetic deposition of hydroxyapatite on brushite single crystals grown by the gel technique, *Materials Letters*, **49**, 2001, pp. 15–19.
- [18] F.S. Utku, E. Seckin, G. Goller, C. Tamerler, M. Urgen, Carbonated Hydroxyapatite deposition at physiological temperature on ordered titanium oxide nanotubes using pulsed electrochemistry, *Ceramics International*, **40**, 2014, pp. 15778–15789.
- [19] L. Addadi, S. Weiner, Interactions between acidic proteins and crystals: stereo-chemical requirements in biomineralization, *Proc Natl Acad Sci*, **82**, 1985, pp. 4110–4.
- [20] R. Zhang, P.X. Ma, Poly( $\alpha$ -hydroxy acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology, *J Biomed Mater Res.* **44**, 1999, pp. 446–55.
- [21] FS. Utku, E. Yuca, E. Seckin, G. Goller, A. Yazgan-Karatas, M. Urgen, C. Tamerler, Protein-mediated hydroxyapatite composite layer formation on nanotubular titania, *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, **4**, 2015, pp. 1–11.
- [22] K.S. Kar, S. Raja, M. Misra, Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO<sub>2</sub> for implant applications, *Surf. Coat. Tech.*, **201**, 2006, pp. 3723–3731.