

Klinoptilolit Katkılı Hidroksiapatitin Sentezi ve Karakterizasyonu

*Makale Bilgisi / Article Info

Alındı/Received: 12.09.2023

Kabul/Accepted: 07.03.2024

Yayımlandı/Published: 29.04.2024

Synthesis and Characterization of Clinoptilolite Doped Hydroxyapatite

Esmâ DALDİKEN¹, Fatma Zehra KOÇAK^{*2}, Nilüfer KÜÇÜKDEVECİ²

¹ Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanobilim ve Nanoteknolojisi Anabilim Dalı, Nevşehir, Türkiye

² Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Nevşehir, Türkiye

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

Öz

Kemik dokusunun temel inorganik bileşeni olan kalsiyum fosfat temelli hidroksiapatit (HA) bileşiği, yüksek biyouyumluluğu ve biyomimetik yapısı sayesinde kemik doku onarımında skafold ve dolgu malzemesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak saf HA'nın yüksek stabilitesi nedeniyle vücutta çözünürlüğünün düşük olması dokuların iyileşme sürecini uzatmaktadır. Bu nedenle, hidroksiapatiti farklı iyonik katkılarla ya da minerallerle zenginleştirme yönünde çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada silisyum bakımından zengin bir zeolit türü olan klinoptilolit (CLP) mineralinin saf HA'ya katkı olarak stokiometrik HA'nın sol-jel yöntemiyle üretimi sırasında eklendiği bileşimler araştırılmıştır. %5 oranında CLP katkılı HA'nın sentezi araştırılarak saf HA ve doğal CLP ile karşılaştırmalı olarak karakterize edilmiştir. Biyomimetik iyon içerikli HA+%5 CLP bileşikler biyoapatit yapısına benzer nano-çubuk şekilde poroz bir morfolojide elde edilmiştir. HA'ya CLP katkısı ortalama partikül boyutunu ve porozite miktarını bir miktar düşürmüştür. Biyolojik testler, tüm numunelerin Saos-2 hücresi ile biyouyumlu olduğunu ve CLP katkılı HA bileşiğinin en yüksek biyouyumluluğa sahip olduğu göstermiştir. Sol-jel yöntemi ile üretilen nano-çubuksu şekli, içeriği ve poroz yapısı nedeniyle biyomimetik HA+%5CLP bileşiminin, ileriki çalışmalarla desteklenebilecek, kemik yenilenmesini teşvik edici potansiyel bir kemik dolgu malzemesi olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Doku Mühendisliği; Hidroksiapatit; Klinoptilolit; Zeolit.

Abstract

Hydroxyapatite (HA) which is a calcium phosphate based, main inorganic component of the bone tissue, is commonly used as scaffold or filler material in bone repair owing to its high biocompatibility and biomimetic structure. However, due to high stability of pure HA, its low resorbability extends the recovery time of tissues. Therefore, various studies have been carried out towards enrichment of HA with different ionic or mineral additives. In this study, clinoptilolite (CLP) mineral which is a type of zeolite being rich in silicon was added into stoichiometric HA during its production by sol-gel method. By investigating the synthesis of CLP (5%) doped HA, it was characterized comparatively with pure HA and natural CLP. The HA+5% CLP compound comprising biomimetic ions were obtained in the shape of nano-rods resembling to bioapatite. The CLP additive to HA influenced slight decrease of the mean particle size and porosity. The biological tests have indicated that all samples were biocompatible with Saos-2 cells and HA+5% CLP compound had the highest biocompatibility. Being biomimetic by the content, nano-rod shape and porous structure, HA+5% CLP compound produced by sol-gel method might be considered potential candidate as a bone filler material to induce bone regeneration which could be supported by further studies.

Keywords: Tissue Engineering; Hydroxyapatite; Clinoptilolite; Zeolite

1. Giriş

Kemik dokuların onarımı ve yenilenmesi için biyouyumlu, biyomimetik ve biyoaktif özellikleri sayesinde doğal dokular ile etkileşim göstererek osteojenez ve anjiyojenez proseslerini destekleyici fonksiyonel biyomalzemelerin geliştirilmesine son yıllarda önemli derecede ihtiyaç duyulmaktadır.

Kemiğin organik fazının büyük bir kısmını kollajen molekülleri oluştururken inorganik fazını hidroksiapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) minerali oluşturmaktadır. Ancak, biyolojik

apatit kristal yapısında, SiO_4^{4-} , CO_3^{2-} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , F^- ve Cl^- pek çok eser miktarda iyon katkısı içermektedir (Kannan vd., 2006). Hidroksiapatit (HA) doğal kemik yapısına olan benzerliği sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında yapay kemik greftleri için en yaygın kullanılan biyomalzemedir (Granito vd., 2018; Panda vd., 2021). Hidroksiapatit, biyoaktif yani canlı doku ile kimyasal bağ oluşturabilen yüzey özellikleri sayesinde kemik yenilenmesinde önemli bir yere sahiptir. Bu sayede hidroksiapatit, hücre tutunmasına, osteoiletkenliğe,

osteoblast kemik hücresinin oluşumuna, osteoblastların alkalik fosfat salgılamasına ve böylece kemiklerin erken iyileşmesine katkı sağlamaktadır (Arun Kumar vd., 2015; Liu vd., 2013). Bu nedenle hidroksiapatit kemik dolgu malzemeleri (Higashi vd., 1986), implant kaplamaları (Darr vd., 2004) ve ilaç salınımı (Matsumoto vd., 2004) gibi çeşitli biyomalzeme uygulamalarında kullanılmaktadır. Ancak, birçok *in-vivo* deneyde biyoaktifliği kanıtlanan hidroksiapatitin doğal apatite göre biyolojik çözünürlüğü düşüktür, bu nedenle yavaş osteointegrasyonla birlikte doku iyileşme süresinin uzun olmasına sebep olmaktadır (Iqbal vd., 2016).

Esas olarak biyolojik apatitin yapısında yer alan karbonat, silikat, magnezyum, potasyum gibi iyonların varlığı onun kristal yapısı, termal davranışı, biyolojik çözünürlüğü, hücrelerle olan etkileşimi ve osteoentegrasyon gibi pek çok fonksiyonuna etki etmektedir (Juhász ve Best, 2012). Bu nedenle hidroksiapatitin farklı iyonik katkıları ile sentezi çalışmaları gerçekleştirilmektedir (Bang vd., 2014; Landi vd., 2006). HA bileşiklerine katkı olarak kullanılan önemli bir iyon, kemik mineral dengesi ve iskelet sağlığı açısından oldukça önemli bir element olan silisyumu yapısında bulunduran silikat anyonudur (SiO_4^{4-}). Doğada oksijenden sonra en bol bulunan elementlerden birisi olan silisyum, insan vücudunda çeşitli dokularda farklı oranlarda yer almaktadır. Silikat iyonu hidroksiapatit kristal yapısında PO_4^{3-} iyonu ile yer değiştirip tane boyutunu düşürerek apatitin çözünürlüğünü artırır. Ayrıca, silikat iyonu reaktif bir bölge oluşturur ve hyaluronik asit, heparan sülfat gibi Ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerini bağlayıcı görevler üstlenerek kırıkta ve kemik gibi bağ dokuların dayanımını arttırmaktadır (Pietak vd., 2007). Bunun yanı sıra, yüksek oranda silisyum içeren biyocamların ve polimer kompozit formlarının osteojenez prosesini ve kollajen üretimini desteklediği bildirilmektedir (Lu vd., 2003; Pietak vd., 2007).

Zeolitler genel kimyasal formülü $[\text{Al}_{nx}\text{Si}_{n(4-x)}\text{O}_{n8}]^{nx-}$ olan alümina silikat mineralleridir. Zeolitler, geniş yüzey alanı, moleküler seçicilik, iyon değişimi ve yüksek adsorbsiyon yeteneği gibi önemli özelliklere sahiptirler (Sahin, 2014). Zeolitlerin biyoyumlu olan türleri biyomedikal uygulamalarda da kullanılabilir (Koçak vd., 2022; Serati-Nouri vd., 2020; Zarrintaj vd., 2020). Bunlar arasında, örneğin; klinoptilolit kanser tedavisinde destek terapi ajanı olarak (Pavelić vd., 2000); faujasit, jelatin matriksli skafoldlarda yara iyileşmesini tetikleyici mineral bileşenlerinde (Ninan vd., 2013) ve Na-A tipi zeolitler ise pektin bazlı ilaç salınım sistemlerinde modülatör olarak kullanıldığında (Kocaaga vd., 2019) potansiyel üstün özellikler sergilemişlerdir.

Klinoptilolit (CLP), zeolit ailesinin bir üyesi olup temel molekül formülü $(\text{K}_2,\text{Na}_2,\text{Ca})_3\text{Al}_6\text{Si}_{30}\text{O}_{72}\cdot 21\text{H}_2\text{O}$ şeklindedir (Wang ve Peng, 2010). Klinoptilolit minerali volkanik patlamalar sonucu, monoklinik kristal yapıda doğal cam formunda oluşan silikatça oldukça zengin bir alüminosilikat mineralidir (~%60-75). Beyazdan kırmızımsı renge değişebilen görünümdeki CLP mineralinin Mohs-sertliğinin 3.5-4 ve özgül ağırlığının 2.1-2.2 g/cm³ olduğu belirtilmiştir (Mansouri vd., 2013; Servatan vd., 2020). Doğal CLP minerali ısı ve asitlere karşı dayanıklı olup genel olarak 700 °C'nin altındaki sıcaklıklarda kristal yapısı kararlıdır (Erdoğan vd., 2008; Tok, 2009). Klinoptilolit gözenekli yapıya sahip olması (%35-40) ve biyoyumluluğu sayesinde ilaç endüstrisinde ve biyomedikal alanlarda çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır (Pavelić vd., 2000; Servatan vd., 2020). Klinoptilolit, yüksek biyoyumluluğu, poroz ve iyonik yapısı sayesinde kanser tedavilerinde adjuvant olarak (Pavelić vd., 2000), antoksidan ve antiinflamasyon özellikli uygulamalarda (Servatan vd., 2020), kitosan temelli kompozit yara örtü malzemesi olarak (Barbosa vd., 2016), ilaç salınımı ve biyosensör gibi çeşitli uygulamalarda (Servatan vd., 2020) kullanılmaktadır.

Kemik skafoldlarında hidroksiapatitin osteoentegrasyon süresini kısaltmak için sinterleme sıcaklığının değiştirilmesi, gözenekli yapı kazandırma gibi birçok çalışma gerçekleştirilmektedir. Diğer bir strateji olarak, yapılan çalışmalarda hidroksiapatite zeolit eklendiğinde, HA'nın osteoiletkenlik ve kemik yenileme performansının artırıldığı bildirilmektedir (Iqbal vd., 2016). Sentetik bir zeolit katkısının (Zeolit-Y), HA bileşiminin mikrodalga sentez yöntemi ile üretimi sırasında katkı olarak eklendiği bileşikler araştırılmış ve biyoyumlu özellikler sergilemiştir (Iqbal vd., 2014). Klinoptilolit katkı hidroksiapatit bileşikleri hakkında literatürde birkaç çalışmaya rastlanmıştır (Kalkandelen, Gunduz, vd., 2017; Karacaylı vd., 2010; Sadeghinia vd., 2020). Karacaylı vd., (2010), çalışmalarında HA tozunu sığır kemiğinin kalsinasyonu yoluyla üreterek doğal CLP minerali ile karıştırarak katı hal reaksiyonu ile 1200 °C ve 1300 °C gibi yüksek sıcaklıklarda sinterlenmesi sonucu katı formdaki kompozitlerin üretimi ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Sığır kemiği kaynaklı HA'ya CLP ilavesine ek olarak alümina eklendiği benzer katı formlar da kemik yer değişimi skafoldları olarak kullanım için incelenmiştir (Kalkandelen, Gunduz, vd., 2017). Belirtilen çalışmalarda numuneler toz değil katı formda olup oldukça yüksek sinterleme sıcaklıklarına tabi tutulmuştur. Bu çalışmalarda mekanik özellikler güçlendirilmiştir ve 100-120 MPa civarındaki basma mukavemeti değerine ulaşılmıştır. Ancak 1300 °C gibi yüksek sıcaklıklarda

sinterleme işlemi sonrası poroz yapının kaybolarak yerini katı formların aldığı görülmektedir (Kalkandelen, Gunduz, vd., 2017). Bu durumda bahsedilen skafoldlar kemiğe mekanik destek sağlasa da kemik ile osteointegrasyonu ve osteoiletkenlik özelliklerini kısıtlayabileceği düşünülmektedir. Şu durum vurgulanmalıdır ki kemik yenilenmesini teşvik edici biyomalzemelerin hücrelerin hareketi, yapışması ve göçüne ve ayrıca içerisinden kan damar ağlarının geçişine imkan veren birbirine içten bağlı makro ve mikro poroziteye sahip olması kemik rejenerasyonu ve ilaç salınımı uygulamaları için oldukça elzemdir (Jagadale vd., 2016). Literatürde bildirilen, kitosan-jelatin-HA-CLP polimer bazlı hibrit kompozitlerin oldukça biyouyumlu ve poroz bir yapıya sahip oldukları görülmüştür ancak mekanik dayanımları nispeten düşüktür (Sadeghinia vd., 2020).

Bu çalışmada, HA'nın bir yaş kimyasal metot olan sol-jel yöntemi ile sentezi sırasında CLP ilavesi ile üretilen nano-tozların kemik yenilenmesini teşvik edici dolgu malzemesi olarak kullanımı bilginiz dahilinde ilk kez araştırılmaktadır. HA'nın sentetik olarak üretimi de çalışmanın tekrarlanabilirliğinin arttırmasının yanı sıra doğal kemik kaynaklarındaki pirojenlerin uzaklaştırılmasındaki zorluk ve gereken yüksek sıcaklık işlemlerinden kaçınılmasını sağlar. Sol-jel yöntemi ile bileşenlerin moleküler seviyede etkileşiminin sağlanarak HA'ya ilave edilen CLP mineralinin ek kafes yapısında yer alan silikat, sodyum, potasyum, magnezyum gibi biyometik iyonların HA'da bulunan kalsiyum ve fosfat gibi iyonlar ile etkileşimi sayesinde yapının biyoçözünürlüğünün arttırılması öngörülmektedir. Bu sayede yüksek silikat içerikli nano-kompozit tozların kemiğin biyomineralleşme kapasitesi, osteoiletkenlik ve anjiyenez gibi biyolojik fonksiyonların güçlendirilerek nihai kemik yenilenme potansiyelinin arttırılması amaçlanmaktadır. Bu çalışma kapsamında sol-jel temelli CLP-doplu HA nano-tozları sinterlenmeksizin kullanılmıştır. Bunun nedeni, çok yüksek sıcaklıklarda sinterleme işlemi sonrası HA katılaşıp mukavemeti artarken hücrelerin tutunması ve göçüne izin vermeyen gözenek içermeyen katı bir yapı oluşmaktadır ve dolayısıyla malzemenin biyouyumu düşmektedir. Literatürdeki *in-vivo* hayvan deneylerinde 1200 °C gibi yüksek sıcaklıklarda sinterlenmiş HA çoğunlukla çözünmeden dokuda birikme yaparken, sinterlenmemiş ya da 900 °C'nin altında sinterlenen HA'nın biyolojik olarak çözünerek doku ile yer değiştirdiği ve önemli derecede bir farkla yeni kemik oluşumunu arttırdığı bildirilmektedir (Dau vd., 2020; De Carvalho vd., 2019). Bu çalışmada, HA'nın sol-jel kimyasal reaksiyonu ile sentezi sırasında CLP minerali, kalsiyum öncü çözeltisinin %5'i

oranında HA'nın stokiometrik oranı değiştirilmeksizin ilave olarak katılandırılmıştır. Biyometik bileşim ve morfolojiye sahip, poroz yapıları nano-boyutlu CLP-doplu HA partikülleri elde edilmiştir. Sentezlenen saf HA numunesi, %5 CLP katkılı HA ve doğal CLP toz numunelerine ait analizler karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin yapısı, morfolojisi ve element bileşimi X-Işını Kırınımı (XRD), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR)-Azaltılmış Toplam Yansıma (ATR), Brunauer-Emmett-Teller (BET), Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizleri ile karakterize edilmiştir. Numunelerin biyouyumluluk özellikleri *in-vitro* sitotoksikite testleri ile kemik türevli osteosarcoma hücreleri (Saos-2) kullanılarak WST-8 tekniği ile üç farklı zaman diliminde test edilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Saf ve klinoptilolit katkılı hidroksiapatit nano-partiküllerin sol-jel yöntemi ile sentezi

Saf HA tozları, bir yaş kimyasal sentez metodu olan sol-jel yöntemi kullanılarak önceden bildirilen çalışmalarımıza benzer şekilde sentezlenmiştir (Kocak vd., 2022b, 2022a). Stokiometrik oranda HA sentezi için, 0,5 M kalsiyum nitrat tetra-hidrat ve 0,3 M di-amonyum hidrojen fosfat (Merck, Almanya) öncü çözeltileri sırasıyla saf etanol (%99.9; Fluka, Almanya) ve ultra saf su içerisinde çözülerek eşit hacimde hazırlanmıştır. Doğal klinoptilolit numunesi Rota Madencilik 'ten (Manisa, Türkiye) temin edilmiştir. %5 CLP katkılı HA bileşiği, CLP tozunun kalsiyum öncü çözeltisi içerisinde süspansiyonu oluşturularak hazırlanmıştır. Sentez işlemi manyetik karıştırıcılı ceketli bir balon ısıtıcı içine yerleştirilmiş üç boyunlu bir cam reaktörde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sıcaklığı 70 °C'ye ayarlanarak kalsiyum öncüsü üzerine fosfat öncü çözeltisi damla damla ilave edilerek sürekli karıştırma sağlanmıştır. Reaksiyon sırasında düzenli aralıklarla amonyum hidroksit solüsyonu (%25; ISOLAB, Almanya) ilavesi ile pH değeri 10 olarak ayarlanmıştır. 4 saatlik toplam reaksiyonun ardından HA kristallerinin oluşturduğu beyaz solüsyon filtre edilerek elde edilen partiküllerin tekrarlı yıkama sonrası pH değeri nötralize edilmiştir. Yaş HA kristalleri 100 °C'de 24 saat kurutularak toz HA numuneleri elde edilmiştir ve bu çalışma dahilinde numuneler herhangi bir sinterleme işlemi uygulanmaksızın kullanılmıştır.

2.2 Karakterizasyon çalışmaları

Üretilen saf HA, %5 CLP katkılı HA (HA + %5 CLP) ve doğal CLP minerallerinin morfolojik, kimyasal, termal ve biyolojik özellikleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. SEM morfoloji analizleri için öncesi numunelerin yüzeyi

kaplama (Au-Pd: 80:20) işlemine tabi tutulmuştur. SEM görüntüleri ZEISS marka Gemini 500 modeli cihazda, 3kV voltajda elde edilmiştir. BET yüzey alanı analizinde numunelerin içerisindeki gazların uzaklaştırılması için 200 °C'de ön-ısıtma işlemi uygulanmıştır. Analizler dengelenmiş adsorpsiyon tekniği kullanılarak adsorptivite inert N₂ gazı atmosferinde Micromeritics-Gemini VII marka BET cihazında gerçekleştirilmiştir.

Toz numunelerin genel kimyasal fonksiyonel grup analizleri FT-IR cihazının (Perkin Elmer Spektrum 100) ATR tekniği kullanılarak 500-4000 cm⁻¹ dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kristalin fazlar ve kristalinite gibi özelliklerini tespit etmek için XRD analizleri Rigaku Miniflex 600 cihazında Cu-K α ışığı kullanılarak 10°/dk hızında gerçekleştirilmiştir. Toz numunelere ait X-ışını kırınım desenleri 5° ile 90° 2 θ değer aralığında 0.02°'lik adım genişliklerinde elde edilmiştir. Analiz sonuçları ICDD kristalografi veri tabanında bulunan referanslar ile karşılaştırılarak mevcut fazlar ve bileşikler belirlenmiştir.

Biyouyumluluk analizleri için numunelerin kemik türevli osteosarcoma hücreleri (Saos-2) kullanılarak WST-8 tekniği ile sitotoksosite testleri 3 farklı zaman diliminde (24, 48 ve 72 saat) uygulanmıştır. Saos-2 hücre hattı (ATCC kökenli, pasaj no:12), %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Pan Biotech P30-1301) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri ile 75-T flask içerisinde çoğaltılmıştır. Hücre sayımı, Trypan mavisini (Gibco) uygulanan hücreler için Logos Luna II cihazında gerçekleştirilmiştir. Hücreler 96-kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 10⁴ hücre gelecek şekilde ekilerek üzerine %10 FBS'li DMEM besiyeri ilave edilmiştir. Biyolojik analizler öncesi örnek toz numuneler otoklavda 15 dakika sterilize edildikten sonra 1 mL DMEM besiyeri ile karıştırılarak stok solüsyonlar hazırlanmış ve 1 saat boyunca sonikatör yardımıyla homojenize edilmiştir. 0,1 mg/mL deney solüsyonları 96'lık plakalardaki kuyucuk içerisine eklenmiştir. Sadece hücre ve besiyeri bulunan kuyucuk negatif kontrol ve ilave 2 μ L H₂O₂ içeren kuyucuk pozitif kontrol, sadece besiyeri içeren kuyucuk ise blank olarak adlandırılmıştır. Her grup için 3 tekrarlı kuyucuklar hazırlanmıştır.

Hücreler üzerine test numuneleri uygulandıktan sonra hücreler 22 saat inkübatörde bırakılmıştır. 22 saat sonunda kuyucuk hacminin %10'u kadar WST-8 solüsyonu eklenerek plakalar 2 saat boyunca ışık geçirmeyecek şekilde folyo ile kaplanarak inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra hücre kültür kabında 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yüzde canlılık oranları Denklem 1'de verilen standart formül ile

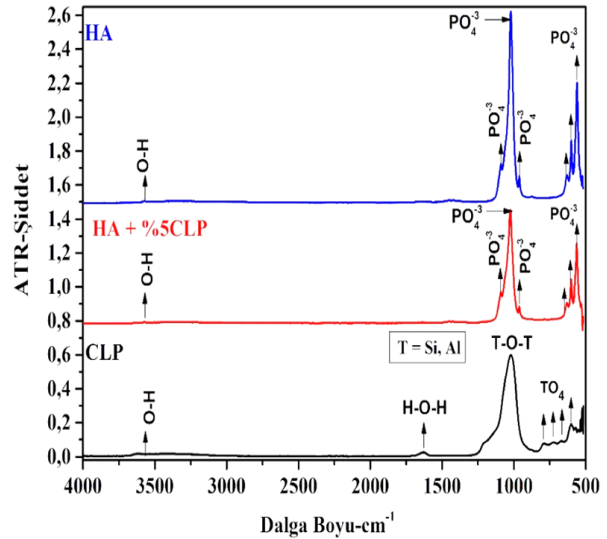
hesaplanmıştır. Aynı işlemler 48 saat ve 72 saat sonrası canlılık testleri için de tekrar edilmiştir.

$$\% \text{ Canlılık Oranı} = \frac{(\text{Deney kuyucuğu} - \text{Blank})}{(\text{Negatif Kontrol} - \text{Blank})} * 100 \quad (1)$$

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. FT-IR kimyasal analizleri

Sentezlenen kurutulmuş saf HA ve %5 CLP katkılı HA (HA+%5CLP) ile doğal CLP numunelerine ait ATR-IR kimyasal analizlerine ait ATR spektrumları Şekil 1'de verilmiştir. Sonuçlara göre, HA numunesinde 3572 cm⁻¹ dalga boyunda yer alan pik hidroksil (O-H) gruplarına ait asimetrik uzama vibrasyon türüne atfedilmiştir. 1021 cm⁻¹ dalga boyunda görülen en şiddetli pik ve solunda yer alan küçük pik (1089 cm⁻¹'de) değerlerinin karakteristik PO₄³⁻ (v₃) grubuna ait olduğu belirtilir (Rehman ve Bonfield, 1997). Raman spektroskopisinde daha çok aktif olan PO₄³⁻ (v₁) grubu ise 962 cm⁻¹ dalga boyunda küçük bir pik olarak yer almaktadır (Khan vd., 2013). PO₄³⁻ (v₄) fonksiyonel grupları ise artan şiddet ile sırasıyla 630 cm⁻¹, 600 cm⁻¹ ve 560 cm⁻¹ dalga boylarında görülmektedir (Kocak vd., 2022b; Rehman ve Bonfield, 1997).



Şekil 1. Saf HA, %5 CLP katkılı HA (HA+%5 CLP) ve CLP numunelerine ait ATR analiz spektrumları

Klinoptilolit numunesine ait spektrumda 3000-3700 cm⁻¹ dalga boyu aralığında bulunan geniş alana ait bölgenin izole silanol gruplarına ait Si-(OH) grupları uzama titreşimlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir. 3621 cm⁻¹'deki en belirgin pik ise Si-O(H)-Al fonksiyonel grubuna atfedilmiştir (Garcia-Basabe vd., 2010). 1627 cm⁻¹ dalga boylarında görülen pik ise su moleküllerinin absorpsiyonundan kaynaklı H-O-H bağlarının eğilme

vibrasyon hareketleri nedeniyle olduğu düşünülür (Iqbal vd., 2014; Puszka vd., 2023). Şiddeti en yüksek olan 1020 cm^{-1} dalga boyunda açığa çıkan pikin ise TO_4 (T: Si ve Al) tetrahedra moleküllerine ait T–O–T asimetrik uzama titreşim hareketleri sonucu olduğu söylenebilir (Mansouri vd., 2013; Shumskaya vd., 1999) ve bu pikin mineralin de-alüminasyon oranıyla orantılı olarak 1090 cm^{-1} değerlerine kadar kayabildiği belirtilmiştir (Garcia-Basabe vd., 2010). $600\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında yer alan piklerden 787 cm^{-1} ve 600 cm^{-1} 'deki pikler tetrahedraların sırasıyla O–T–O simetrik uzama ve çift halka titreşim hareketlerine atfedilmiştir (Garcia-Basabe vd., 2010; Rodríguez-Fuentes vd., 1998).

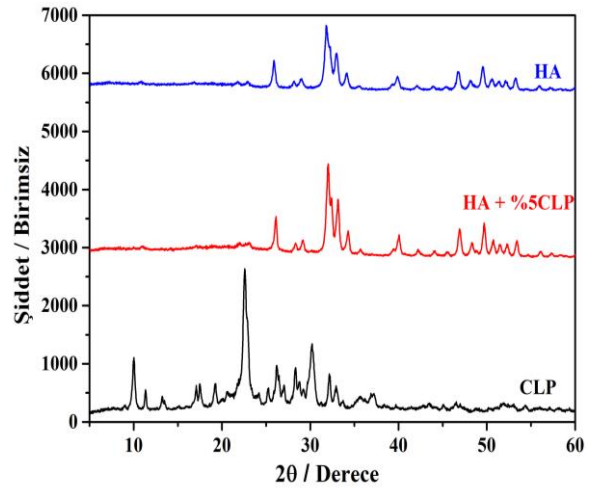
3.2. XRD analizleri

X-ışını difraksiyon tekniği ile CLP, HA+%5CLP ve HA numunelerinin kristal yapıları incelenmiş ve X-ışını kırınım desenleri Şekil 2'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Saf HA'ya ait 2θ değerleri, ICDD kristalografi veri tabanında bulunan 01-072-1243 numaralı HA referans PDF kartı ile örtüşmüştür. En şiddetli HA piki $2\theta = 31.82^\circ$ iken diğer şiddetli HA pikleri sırasıyla 32.95° , 32.19° , 25.88° , 34.11° , 22.89° ve 34.11° değerlerinde yer almaktadır. Klinoptilolit mineraline ait pik şiddetlerinin çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum saf CLP'nin daha yüksek kristaliniteye sahip olduğuna işaret etmektedir. $2\theta = 9.98^\circ$, 11.35° , 17.47° , 22.49° , 22.60° ve 30.18° bölgelerinde şiddetli pikler görülmektedir. Bu pikler ICDD veri tabanındaki referans numarası 00-039-1383'e göre klinoptilolite ait pikleridir (Dosa vd., 2022; Galletti vd., 2021). Hidroksiapatite %5 CLP katkısı yapıldığında kristalinite bir miktar artışa neden olduğu X-ışını kırınım deseninden anlaşılmaktadır.

3.3. BET yüzey analizleri

BET analizi biyokompozit içerisindeki nano-ölçekte gözeneklerin ve spesifik yüzey alanının karakterize etmek için kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre, HA ve HA+%5 CLP numunelerine ait BET spesifik yüzey alanları sırasıyla 47.68 ve $21.9\text{ m}^2/\text{g}$ olarak ölçülmüştür. Ayrıca, BJH (Barrett-Joyner-Halenda) yöntemiyle belirlenen HA ve %5 CLP katkılı HA numunelerine ait gözenek çapları sırasıyla 30.58 ve 4.7 nm olarak belirlenmiştir. %5 CLP katkılı HA'nın saf HA'ya göre BET spesifik yüzey alanının ve gözenek boyutunun düştüğü anlaşılmaktadır. Bu durumun temel sebebinin, HA üretiminde kullanılan kalsiyum ve fosfat öncü miktarlarının düşürülmeksizin stokiyometrik oranın korunması ve buna ilaveten CLP'nin, kalsiyum öncüsünün %5'i oranında ilave olarak eklenmiş olmasıdır. Bu durumda, CLP katkılı numunede artan

madde miktarı ile, bekleneneği gibi gözenekler bir miktar kapanmıştır. Ayrıca HA partiküllerinin iyonik olarak CLP nano-plakalar üzerine yapışması sonucu yüzey alanı miktarının düştüğü düşünülmektedir.



Şekil 2. Saf HA, %5 CLP katkılı HA (HA+%5 CLP) ve CLP numunelerinin X-ışını kırınım desenleri

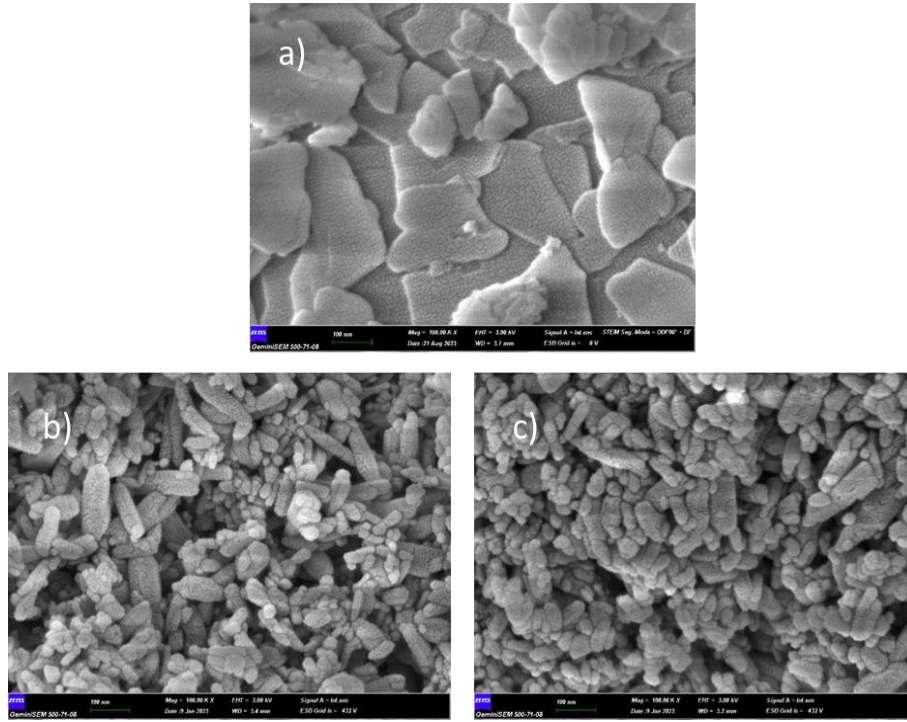
3.4. SEM morfoloji analizleri

Klinoptilolit, HA ve %5 CLP katkılı HA numunelerine ait SEM morfoloji görüntüleri Şekil 3'te verilmektedir. Klinoptilolit'in 100,000 büyütmede elde edilen görüntüsünde ince plaka şeklinde katmanlı bir morfolojik yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar, literatürde verilen doğal CLP'ye ait morfolojik görüntüler ile benzerlik göstermektedir (Schiavo vd., 2023; Zhan vd., 2013). Sırasıyla, Şekil 3.b. ve Şekil 3.c.'de verilen saf HA ve %5 CLP katkılı HA numunelerine ait görüntüler benzer, dağılımı çok homojen olmamakla birlikte, Image-J programı yardımıyla belirlenen partikül boyut ölçümlerine göre CLP, saf HA ve %5 CLP katkılı HA tozlarının ortalama tane boyutu $146,42\text{ nm}$, $58,36\text{ nm}$ ve $51,36\text{ nm}$ olarak hesaplanmıştır. CLP katkısı yapılarak üretilen HA tozunun boyutunun saf HA'ya kıyasla az miktarda düştüğü anlaşılmaktadır. Singh ve arkadaşları (2021), silikat bazlı biyomalzemelerin partikül boyutunu azaltıcı etkiye neden olduğunu belirtmiştir. Literatürle uyumlu nispeten daha küçük, çubuk şeklindeki HA partiküllerinin geniş CLP nano-plakaları üzerine yapışarak dağıldığı bu nedenle HA'nın mevcut gözenek boyutunun azaldığı düşünülmektedir. Benzer durum, hidrotermal sentez yoluyla üretilen A-tipi zeolit-HA bileşikleri için gözlenmiştir (Watanabe vd., 2006).

Iqbal ve arkadaşlarının mikrodalga destekli çöktürme yöntemiyle sentezlediği %5 zeolit katkılı- HA kompozitin ortalama tane boyutu $75\text{--}79\text{ nm}$ olarak belirlenmiştir (Iqbal vd., 2014). Diğer bir çalışmada ise %5 ZSM katkılı-

HA kompozit için ortalama tane boyutunun yaklaşık 90 nm olduğu belirtilmiştir (Iqbal vd., 2016). Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre %5 klinoptilolit katkılı HA'nın ortalama tane boyutu literatürdeki yapılan benzer çalışmalardaki sentezlenen kompozitlerin tane boyutlarına göre nispeten daha düşük olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca saf HA ve %5 CLP katkılı HA toz morfolojilerine baktığımızda yapılarında küçük mesafeye sahip şekilsiz yapıda birçok gözeneklerin (porozitenin)

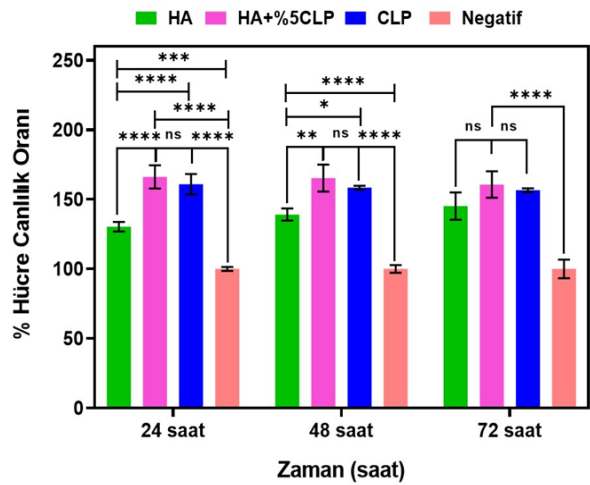
varlığı görülmektedir. Hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını kolaylaştırdığı için ilaç taşıyıcı biyomadikal uygulamalarda ve kemik dokusu mühendisliğinde HA'da gözenekli yapının oluşumu önemlidir (Jagadele vd., 2016). %5 CLP katkılı HA tozlarında CLP mineralinin HA yapısına ek olarak katılanmış olması sonucu porozite miktarında bir miktar azalma gözlenmektedir. Bu durum BET analiz sonuçlarıyla da desteklenmiştir.



Şekil 3. a) Doğal CLP, b) Saf HA ve c) %5 CLP katkılı HA tozlarının morfolojisi

3.5. Biyouyumluluk analizleri

Üç farklı zaman diliminde (24, 48 ve 72 saat) gerçekleştirilen sitotoksitesite testlerine ait sonuçlar Şekil 4'te verilmiştir. Sonuçlara göre sadece hücre içeren negatif kontrole kıyasla hücre ekili olan tüm numunelerin tüm test periyotlarında canlılık oranı yüzdeleri istatistiki olarak da önemli derecede yüksek bulunmuştur. 24 saat sonrası canlılık testlerine göre HA+%5 CLP numunesinin saf HA numunesine göre biyouyumluluğunun önemli derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0,0001$). HA+%5 CLP ile CLP numuneleri canlılık oranları arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmazken, CLP numunesine ait biyouyumluluğun saf HA'ya göre daha yüksek olduğu görülmüştür. 48 saatlik testte HA'nın biyouyumluluğu 24 saate kıyasla artmıştır. Hücre kültüründe 72 saatlik testlerde 48 saate kıyasla hücre canlılık yüzdesi HA numunesinde artarken değer olarak daha yüksek canlılığa sahip olan CLP ve HA+%5 CLP numunelerinde hafif bir duraklama ve azalış gözlenmiştir.



Şekil 4. Saf HA, CLP ve %5 CLP katkılı HA numunelerine ait % Hücre Canlılık Oranları ve standart sapma miktarlarını gösteren grafik. İstatistiki analiz GraphPad Prism programında 2-Way ANOVA yöntemiyle TUKEY testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ($\alpha: 0,005$ ve $0,1234$ (ns), $0,0332$ (*), $0,0021$ (**), $< 0,0001$ (***)).

İqbal ve arkadaşları tarafından mikrodalga destekli çöktürme metodu ile sentezlenen farklı oranlarda zeolit ilaveli bioaktif ZSM-5-HA kompozit'inin biyolojik özellikleri incelenmiştir ve üç günlük MTT test periyodu sonuçlarına göre %5 zeolit katkılı HA'nın yüzde canlılık oranı yaklaşık %155 bulunmuştur (İqbal vd., 2016). Literatürde bildirilen başka bir çalışmada, β -TCP-ZSM-5-Jelatin kompozitinin 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerdeki MTT test sonuçlarına göre hücre canlılığının değişmeden yaklaşık %80 olarak kaldığı belirlenmiştir (Yazdanian vd., 2020). Kalkandelen ve arkadaşları inek kemiğinden kalsinasyonla üretilen hidroksiapatitin kullanıldığı (BHA)-CLP- Al_2O_3 kompozitlerini katı hal reaksiyonu ile 1300 °C üzerindeki sıcaklıklarda sinterleme yoluyla elde etmiştir. %5CLP-%5 Al_2O_3 -BHA kompozitinin 3 günlük MTT test periyodundan elde edilen canlılık oranı yaklaşık %135 olarak belirlenmiştir (Kalkandelen, Suleymanoglu, vd., 2017). Bu çalışmada ise 72 saatlik sitotoksite deneyi sonucunda %5 CLP katkılı HA nano-tozların canlılık oranının yaklaşık %165 olduğu görülmüştür. Sentezlenen %5 CLP katkılı HA kompozitin biyoyumluluğunun literatürdeki sonuçlara nispeten daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

4. Sonuç

Bu çalışmada, doğal CLP mineral katkılı HA bileşiklerinin sol-jel metoduyla kimyasal olarak sentezlendiği, biyomimetik mineral içerikli nano-kompozit seramikler incelenmiştir. Sol-jel yöntemi ile moleküler düzeyde etkileşen HA bileşiği ve CLP mineralinin dış iskelesinde yer alan iyonların potansiyel yer değişimi sayesinde nihai kemik yenilenmesi için saf HA'ya göre biyoçözünürlüğünün artırılması amaçlanmıştır. Mikroyapısal analiz sonuçlarına göre, sol-jel yöntemi kullanılarak üretilen biyomimetik şeklindeki nano çubuklar görünümündeki HA partikülleri elde edilmiştir ve CLP partikülleri ise nano-plakalar şeklinde, ince ve geniş yapıdadır. Sentezlenen CLP-doplu HA nano-kompozit seramiklerde yüzey alanı ve gözenek miktarı saf HA'ya göre bir miktar düşmüştür. Bunun sebebinin ise HA kristallerinin CLP yüzeyine yapışması ve CLP'nin stokiyometrik HA'ya ilave katkı olarak eklenmesi sonucu olduğu değerlendirilmiştir. Yapılan kemik hücresi türevli Saos-2 hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre canlılık testlerinde, %5 CLP katkılı HA numunesinin, saf HA'ya kıyasla daha yüksek canlılık oranına (%165) sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, tüm numunelerin sadece hücrelerin bulunduğu kontrole kıyasla tüm zaman dilimlerinde %100'ün üzerinde hücre canlılık oranına sahip olduğu görülmektedir. CLP katkısı ile biyoyumluluğu artırılan HA temelli nano-kompozit tozların, biyomimetik mikroyapı ve kompozisyonu sayesinde kemik dolgu malzemesi olarak kullanıldığında zengin silikat içeriği ile potansiyel pro-

anjyogenik özellikler göstereceği ve iyon yer-değişimi ile biyoçözünürlüğünün artırılması sayesinde *in-vivo* kemik yenilenmesini teşvik etmede üstün potansiyel sergileyeceği öngörülmektedir.

Etik Standartlar Bildirgesi

Yazarlar tüm etik standartlara uyduklarını beyan ederler.

Yazarlık Katkı Beyanı

Yazar 1: Kaynaklar, Araştırma, Deney, Yazma – orijinal taslak
Görselleştirme, Yazma – orijinal taslak

Yazar 2: Kaynaklar, Araştırma, Deney, Fikir Sahibi, Deney tasarımı, Proje Yöneticisi, Danışmanlık, Biçimsel analiz, Doğrulama, Metodoloji, Görselleştirme, Yazma – orijinal taslak

Yazar 3: Araştırma, Deney, Biçimsel analiz, Doğrulama, Metodoloji, Görselleştirme, Yazma – orijinal taslak

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarların bu makalenin içeriğiyle ilgili olarak beyan edecekleri hiçbir çıkar çatışması yoktur.

Teşekkür

Bu araştırma Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: KBP22F01). Ayrıca WST-8 analizinin gerçekleştirilebilmesinde gerekli olan Saos-2 hücre hattını temin eden Dr. Mine Toker'e ve doğal klinoptilolit mineralini teminini sağlayan Rota Madencilik Şirketi'ne (Manisa, Türkiye) teşekkür ederiz.

5. Kaynaklar

Arun Kumar, R., Sivashanmugam, A., Deepthi, S., Iseki, S., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., Jayakumar, R. 2015. Injectable chitin-poly(ϵ -caprolactone) /nanohydroxyapatite composite microgels prepared by simple regeneration technique for bone tissue engineering. *ACS Applied Materials and Interfaces*, **7(18)**, 9399–9409.

<https://doi.org/10.1021/acsami.5b02685>

Bang, L. T., Long, B. D., Othman, R. 2014. Carbonate hydroxyapatite and silicon-substituted carbonate hydroxyapatite: Synthesis, mechanical properties, and solubility evaluations. *The Scientific World Journal*, **87**, 788–796

<https://doi.org/10.1155/2014/969876>

Barbosa, G. P., Debone, H. S., Severino, P., Souto, E. B., Da Silva, C. F. 2016. Design and characterization of chitosan/zeolite composite films - Effect of zeolite type and zeolite dose on the film properties. *Materials Science and Engineering C*, **60**, 246–254.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.034>

- Darr, J. a, Guo, Z. X., Raman, V., Bououdina, M., Rehman, I. U. 2004. Metal organic chemical vapour deposition (MOCVD) of bone mineral like carbonated hydroxyapatite coatings. *Chemical communications*, **6**, 696–697.
<https://doi.org/10.1039/B312855P>
- Dau, M., Ganz, C., Zaage, F., Staedt, H., Goetze, E., Gerber, T., Kämmerer, P. W. 2020. In vivo comparison of a granular and putty form of a sintered and a non-sintered silica-enhanced hydroxyapatite bone substitute material. *Journal of Biomaterials Applications*, **34(6)**, 864–874.
<https://doi.org/10.1177/0885328219877584>.
- De Carvalho, B., Rompen, E., Lecloux, G., Schupbach, P., Dory, E., Art, J. F., Lambert, F. 2019. Effect of sintering on in vivo biological performance of chemically deproteinized bovine hydroxyapatite. *Materials*, **12(23)**, 3946.
<https://doi:10.3390/ma12233946>
- Dosa, M., Grifasi, N., Galletti, C., Fino, D., Piumetti, M. 2022. Natural Zeolite Clinoptilolite Application in Wastewater Treatment: Methylene Blue, Zinc and Cadmium Abatement Tests and Kinetic Studies. *Materials*, **15(22)**, 8191.
<https://doi.org/10.3390/ma15228191>
- Erdoğan, B., Sakizci, M., Yörükoğullari, E. 2008. Characterization and ethylene adsorption of natural and modified clinoptilolites. *Applied Surface Science*, **254(8)**, 2450–2457.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.09.058>
- Galletti, C., Dosa, M., Russo, N., Fino, D. 2021. Zn²⁺ and Cd²⁺ removal from wastewater using clinoptilolite as adsorbent. *Environmental Science and Pollution Research*, **28(19)**, 24355–24361.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-08483-z>
- Garcia-Basabe, Y., Rodriguez-Iznaga, I., De Menorval, L. C., Llewellyn, P., Maurin, G., Lewis, D. W., ... Ruiz-Salvador, A. R. 2010. Step-wise dealumination of natural clinoptilolite: Structural and physicochemical characterization. *Microporous and Mesoporous Materials*, **135(1–3)**, 187–196.
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2010.07.008>
- Granito, R. N., Renno, A. C. M., Yamamura, H., de Almeida, M. C., Ruiz, P. L. M., Ribeiro, D. A. 2018. Hydroxyapatite from fish for bone tissue engineering: A promising approach. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, **7(2)**, 80–90.
<https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.2.80>.
- Higashi, S., Yamamuro, T., Nakamura, T., Ikada, Y., Hyon, S. H., Jamshidi, K. 1986. Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers. *Biomaterials*, **7(3)**, 183–187.
[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(86\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(86)90099-2)
- Iqbal, N., Abdul Kadir, M. R., Iqbal, S., Razak, S. I. A., Shahid Rafique, M., Bakhsheshi-Rad, H. R., ... Abbas, A. A. 2016. Nano-hydroxyapatite reinforced zeolite ZSM composites: A comprehensive study on the structural and in vitro biological properties. *Ceramics International*, **42(6)**, 7175–7182.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.01.107>
- Iqbal, N., Abdul Kadir, M. R., Mahmood, N. H. Bin, Yusoff, M. F. M., Siddique, J. A., Salim, N., ... Kamarul, T. 2014. Microwave synthesis, characterization, bioactivity and in vitro biocompatibility of zeolite-hydroxyapatite (Zeo-HA) composite for bone tissue engineering applications. *Ceramics International*, **40(10)**, 16091–16097.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.07.038>
- Jagadale, P. N., Jagtap, P. P., Joshi, M. G., Bamane, S. R. 2016. A prototype synthesis and characterization of hydroxyapatite bioceramics nanocrystallites. *Advanced Materials Letters*, **7(4)**, 325–329.
<https://doi.org/10.5185/amlett.2016.5837>
- Juhasz, J. A., Best, S. M. 2012. Bioactive ceramics: processing, structures and properties. *Journal of Materials Science*, **47(2)**, 610–624.
<https://doi.org/10.1007/s10853-011-6063-x>
- Kalkandelen, C., Gunduz, O., Akan, A., Oktar, F. N. 2017. "Part 1: Clinoptilolite-alumina-hydroxyapatite composites for biomedical engineering. *Journal of the Australian Ceramic Society*, **53(1)**, 91–99.
<https://doi.org/10.1007/s41779-016-0013-7>
- Kalkandelen, C., Suleymanoglu, M., Kuruca, S. E., Akan, A., Oktar, F. N., Gunduz, O. 2017. "Part 2: Biocompatibility evaluation of hydroxyapatite-based clinoptilolite and Al₂O₃ composites. *Journal of the Australian Ceramic Society*, **53(1)**, 217–223.
<https://doi.org/10.1007/s41779-017-0027-9>
- Kannan, S., Lemos, A. F., Ferreira, J. M. F. 2006. Synthesis and Mechanical Performance of Biological-like Hydroxyapatites. *Chemistry of Materials*, **18(8)**, 2181–2186.
<https://doi.org/10.1021/cm052567q>

- Karacayli, U., Gunduz, O., Salman, S., Ozyegin, L. S., Agathopoulos, S., Sengil, A. Z., OktaR, F. N. 2010. Effect of sintering temperature on mechanical properties and microstructure of zeolite (clinoptilolite) reinforced bovine hydroxyapatite (BHA) composites, R. M. Natal Jorge, S. M. Santos, I R. S. João Manue, R. C. Tavares, & M. A. P. Vaz (Ed.), *Biodental Engineering*. London: Taylor & Francis Group, 105–108
- Khan, A. F., Awais, M., Khan, A. S., Tabassum, S., Chaudhry, A. A., Rehman, I. U. 2013. Raman Spectroscopy of Natural Bone and Synthetic Apatites. *Applied Spectroscopy Reviews*, **48(4)**, 329–355.
<https://doi.org/10.1080/05704928.2012.721107>
- Kocaaga, B., Kurkcuoglu, O., Tatlier, M., Batirel, S., Guner, F. S. 2019. Low-methoxyl pectin–zeolite hydrogels controlling drug release promote in vitro wound healing. *Journal of Applied Polymer Science*, **136(24)**, 1–16.
<https://doi.org/10.1002/app.47640>
- Koçak, F. Z., Küçükdeveci, N., Daldiken, E. 2022. Zeolitlerin Özellikleri ve Doku Mühendisliği Uygulamaları. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **11(2)**, 8–15.
<https://doi.org/10.17100/nevbittek.1178348>
- Kocak, F. Z., Yar, M., Rehman, I. U. 2022a. Hydroxyapatite-Integrated, Heparin- and Glycerol-Functionalized Chitosan-Based Injectable Hydrogels with Improved Mechanical and Proangiogenic Performance. *International Journal of Molecular Sciences*, **23(10)**, 53–70.
<https://doi.org/10.3390/ijms23105370>
- Kocak, F. Z., Yar, M., Rehman, I. U. (2022b). Investigation of Different Synthesis Parameters of Hydroxyapatite For Tissue Engineering Applications. The Sixth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-6), Gaziantep, Turkey, 121–126.
- Landi, E., Tampieri, A., Mattioli-Belmonte, M., Celotti, G., Sandri, M., Gigante, A., ... Biagini, G. 2006. Biomimetic Mg- and Mg₃CO₃-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour. *Journal of the European Ceramic Society*, **26(13)**, 2593–2601.
<https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2005.06.040>
- Liu, Q., Huang, S., Matinlinna, J. P., Chen, Z., Pan, H. 2013. Insight into biological apatite: Physicochemical properties and preparation approaches. *BioMed Research International*, **2013**, 1-13.
<https://doi.org/10.1155/2013/929748>
- Lu, H. H., El-Amin, S. F., Scott, K. D., Laurencin, C. T. 2003. Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **64(3)**, 465–474.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.10399>
- Mansouri, N., Rikhtegar, N., Ahmad Panahi, H., Atabi, F., Shahraki, B. K. 2013. Porosity, characterization and structural properties of natural zeolite - Clinoptilolite - As a sorbent. *Environment Protection Engineering*, **39(1)**, 139–152.
<https://doi.org/10.5277/EPE130111>
- Matsumoto, T., Okazaki, M., Inoue, M., Yamaguchi, S., Kusunose, T., Toyonaga, T., ... Takahashi, J. 2004. Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein. *Biomaterials*, **25(17)**, 3807–3812.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.081>
- Ninan, N., Muthiah, M., Park, I. K., Elain, A., Wong, T. W., Thomas, S., Grohens, Y. 2013. Faujasites incorporated tissue engineering scaffolds for wound healing: In vitro and in vivo analysis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, **5(21)**, 11194–11206.
<https://doi.org/10.1021/am403436y>
- Panda, S., Biswas, C. K., Paul, S. 2021. A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering. *Ceramics International*, **47(20)**, 28122–28144.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.07.100>
- Pavelić, K., Hadžija, M., Bedrica, L., Pavelić, J., Čolić, M., ... Katić, M., ... Čolić, M. 2000. Natural zeolite clinoptilolite: New adjuvant in anticancer therapy. *Journal of Molecular Medicine*, **78(12)**, 708–720.
<https://doi.org/10.1007/s001090000176>
- Pietak, A. M., Reid, J. W., Stott, M. J., Sayer, M. 2007. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, **28(28)**, 4023–4032.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.003>

- Puszka, A., Kneć, M., Franus, W., Podkościelna, B. 2023. Preparation and Thermo-Mechanical Characteristics of Composites Based on Epoxy Resin with Kaolinite and Clinoptilolite. *Polymers*, **15(8)** 1898.
<https://doi.org/10.3390/polym15081898>
- Rehman, I., Bonfield, W. 1997. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **8(1)**, 1–4.
<https://doi.org/10.1023/a:1018570213546>
- Rodríguez-Fuentes, G., Ruiz-Salvador, A. R., Mir, M., Picazo, O., Quintana, G., Delgado, M. 1998. Thermal and cation influence on IR vibrations of modified natural clinoptilolite. *Microporous and Mesoporous Materials*, **20(4–6)**, 269–281.
[https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(97\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(97)00013-9)
- Sadeghinia, A., Soltani, S., Aghazadeh, M., Khalilifard, J., Davaran, S. 2020. Design and fabrication of clinoptilolite–nanohydroxyapatite/chitosan–gelatin composite scaffold and evaluation of its effects on bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **108(2)**, 221–233.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36806>
- Sahin, M. B. 2014. Zeolitler. MTA Doğal Kaynaklar ve Ekonomi Bülteni, **17**, 53–60.
- Schiavo, L., Boccia, V., Aversa, L., Verucchi, R., Carotenuto, G., Valente, T. 2023. Natural Clinoptilolite Nanoplatelets Production by a Friction-Based Technology. *Materials proceedings*, **14(1)**, 11.
<https://doi.org/10.3390/IOCN2023-14474>
- Serati-Nouri, H., Jafari, A., Roshangar, L., Dadashpour, M., Pilehvar-Soltanahmadi, Y., Zarghami, N. 2020. Biomedical applications of zeolite-based materials: A review. *Materials Science and Engineering C*, **116**, 111225.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111225>
- Servatan, M., Zarrintaj, P., Mahmodi, G., Kim, S. J., Ganjali, M. R., Saeb, M. R., Mozafari, M. 2020. Zeolites in drug delivery: Progress, challenges and opportunities. *Drug Discovery Today*, **25(4)**, 642–656.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.02.005>
- Shumskaya, L. G., Kirillova, Y. A., Yusupov, T. S. 1999. Controlled changes in technological properties of phosphates in mechanical activation with zeolites. *Journal of Mining Science*, **35(1)**, 96–100.
- Singh, J., Chatha, S. S., Singh, H. 2021. Characterization and corrosion behavior of plasma sprayed calcium silicate reinforced hydroxyapatite composite coatings for medical implant applications. *Ceramics International*, **47(1)**, 782–792.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.08.189>
- Tok, S. 2009. *Doğal Zeolit (Klinoptilolit) ile Bakır Adsorpsiyonu*. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 62.
- Wang, S., Peng, Y. 2010. Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, **156(1)**, 11–24.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.029>
- Watanabe, Y., Ikoma, T., Suetsugu, Y., Yamada, H., Tamura, K., Komatsu, Y., ... Moriyoshi, Y. 2006. Type-A zeolites with hydroxyapatite surface layers formed by an ion exchange reaction. *Journal of the European Ceramic Society*, **26(4–5)**, 469–474.
<https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2005.07.024>
- Yazdaniyan, M., Tabesh, H., Houshmand, B., Tebyanian, H., Soufdoost, R. S., Tahmasebi, E., ... Ghullame, S. 2020. Fabrication and properties of β TCP/Zeolite/Gelatin scaffold as developed scaffold in bone regeneration: in vitro and in vivo studies. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, **40(4)**, 1626–1637.
<https://doi.org/10.1016/j.bbe.2020.10.006>
- Zarrintaj, P., Mahmodi, G., Manouchehri, S., Mashhadzadeh, A. H., Khodadadi, M., Servatan, M., ... Mozafari, M. 2020. Zeolite in tissue engineering: Opportunities and challenges. *MedComm*, **1(1)**, 5–34.
<https://doi.org/10.1002/mco2.5>
- Zhan, Y., Lin, J., Li, J. 2013. Preparation and characterization of surfactant-modified hydroxyapatite/zeolite composite and its adsorption behavior toward humic acid and copper(II). *Environmental Science and Pollution Research*, **20(4)**, 2512–2526.
<https://doi.org/10.1007/s11356-012-1136-1>