

INVESTIGATION OF HYDROXYAPATİTE AND CALCIUM OXALATE CRYSTALLIZATION AS A MODEL TO BIOMINERALİZATION

Emel AKYOL^{*}, Özlem DOĞAN, Mualla ÖNER

Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Davutpaşa-İSTANBUL

Geliş/Received: 27.08.2004 Kabul/Accepted: 23.05.2005

ABSTRACT

Many current and evolving technologies require crystallization strategies that provide control over the structure, size and morphology of inorganic crystals. This demand exists because many areas of materials fabrication involve particles of modal size and shape. However, although knowledge of the thermodynamic and kinetic factors which might regulate nucleation and control the crystal growth process is extensive, the reproducible fabrication of economic crystalline materials to specific design remains an elusive goal. Much of our awareness of molecular influences on oriented crystallization has come from the study of biomineralization. In general, biominerals are formed by the precipitation of calcium carbonate, calcium phosphate and other minerals within polymeric tissue matrices. It is thought that the organic polymer matrix is the key to the microstructural control. An understanding of biological solid-state interactions would therefore be of immense value in many areas. In this study, hydroxyapatite (HAP) and calcium oxalate crystallization as a model for biomineralization and the effects of polymers for the crystallization have been investigated.

Keywords: Biomineralization, Hydroxyapatite, Calcium oxalate, Crystallization.

BİYOMİNERALİZASYONA MODEL OLARAK HİDROKSİPATİT VE KALSİYUM OKSALAT KRİSTALİZASYONUNUN İNCELENMESİ

ÖZET

Gelişmiş ve gelişmekte olan teknolojiler inorganik kristallerin yapısı, büyüklüğü ve morfolojisini kontrol edebilecek kristalizasyon prosesine gerek duymaktadır. Bu isteğin uzun yıllardan bu yana olmasının nedeni pek çok malzeme üretimi belirli bir boyut ve şekilde parçacıklar gerektirmektedir. Kristal büyüme prosesini ve nükleasyonu düzenleyecek ve kontrol edebilecek termodinamik ve kinetik faktörler çok olmasına rağmen, özel tasarım amaçlı ekonomik kristal maddelerin tekrarlanabilir üretimi en önemli araştırma konularından biridir. Diğer yandan bazı moleküllerin kristalizasyon kontrolünde büyük rol aldığı bilinmektedir ve bu konuya biyomineralizasyon alanında yapılan çalışmalar ışık tutmaktadır. Genelde biyomineraller kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat ve diğer minerallerin polimerik doku maddesine çökmesiyle oluşur. Organik polimer matrisinin mikroyapının kontrolünde anahtar görevi gördüğü düşünülmektedir. Bu biyolojik katı hal reaksiyonunun anlaşılması pek çok alanda önem taşımaktadır. Bu çalışmada biyomineralizasyona model olarak hidroksiapatit (HAP) ve kalsiyum oksalat kristalizasyonu ve polimerlerin bu kristalizasyona etkisi incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Biyomineralizasyon, Hidroksiapatit, Kalsiyum oksalat, Kristalizasyon.

* Sorumlu Yazar/Corresponding Autor: e-posta: eakyol@yildiz.edu.tr, tel: (0212) 449 17 27

1. GİRİŞ

Biyolojik olarak kontrol edilen biyomineraller organik/inorganik kompozit olarak tanımlanabilir ve nanometre seviyesindeki büyüklükte dirler. Biyomineralizasyonda kristal nükleasyonu, faz, morfoloji ve büyüme dinamiği biyopolimerlerce kontrol edilmektedir [1]. Sonuçta oluşan yapı düzenli alt ünitelerden meydana gelir. Mineral büyümesindeki bu derecedeki bir kontrol çoğu zaman mühendislik uygulamalarında istenmektedir [2].

Kalsiyum fosfat oluşumu ve kristal oluşumunun önlenmesi biyolojik mineralizasyonla yakından ilgilidir. İnsan kemiğinin temel inorganik bileşimine benzer kimyasal özellikler göstermesi nedeniyle biyomineralizasyon çalışmalarında HAP model bileşen olarak düşünülebilir. Bu nedenle sentetik olarak üretilmiş saf , istenen özelliklere (yüksek spesifik yüzey alanı, dar boyut dağılımlı küçük partikül boyutu, düşük aglomerasyon derecesi, v.b) sahip HAP kristalleri vitro ve vivo ortamlarda ayrıntılı fizikokimyasal çalışmalarda, tıbbi uygulamalarda ve cerrahide (orta kulak implantı, kemik implantı, v.b.) büyük ilgi görmektedir [3]. Fakat sentetik olarak HAP kristal üretiminde, kalsiyum fosfat sistemlerinin karmaşık doğasından kaynaklanan veya deneysel şartlara (süper doygunluk derecesi, safsızlıkların varlığı, aş kristal, sıcaklık, pH, iyonik güç) bağlı olarak stokiometriden sapmalar olabilmektedir. Bu nedenle HAP kristal üretim prosesinin iyi tanımlanması gerekmektedir [4].

Kalsiyum oksalat da biyolojik mineralizasyon açısından önemlidir. Kalsiyum oksalatlar, özellikle de monohidrat fazı tipik böbrek taşlarının ana maddesini oluşturur. Böbrek taşı tıbbi bir problem olduğundan kristalizasyon araştırmalarında ilgi çekmektedir [5]. Son yıllarda biyolojik mineralleşmenin proteinlerle yönlendirilmesi pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Asidik proteinlerin büyümekte olan kristallerinin yapısına etki ederek kristalin morfolojisinde değişiklik meydana getirdiği uygulama şekline bağlı olarak kristal yüzeyine bağlanıp büyüme durdurduğu veya kristalizasyon hızını arttırdığı gözlenmiştir [6,7].

2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Hidroksiapatit (HAP) Kristalizasyonu

Sabit bileşim kontrollü kristalizasyon yöntemi özellikle kristal büyüme mekanizmasının incelenmesinde, belirli bir aşırı doygunluk aralığında reaksiyonun derecesi çok değiştiğinden, gerekli olmaktadır. Kristal büyümesinin çözeltiye ilave edilen aş kristal üzerinden yürüdüğü çökme deneyleri 37°C ve pH=7.40'de gerçekleştirilmiştir. Polimer varlığında (poliakrilik asit homopolimeri, PAA ve poli(etilen glikol-blok-akrilik asit) kopolimeri ve polimersiz gerçekleştirilen deneylerde kristalizasyon çözeltisinin pH'ı, sıcaklığı ve kalsiyum iyon miktarı geliştirilen yazılım ile sürekli kontrol edilmiş ve sabit tutulmuştur. Çökmenin gözlemlendiği çözeltiye, reaksiyon süresince çöken serbest iyonların karşılığında iki otomatik büret ile titrant ilave edilmiştir. İlave edilen titrantların hacminden kristallerin büyüme hızları hesaplanmıştır.

2.2. Kalsiyum Oksalat Deneyleri

Kristalizasyon proseslerinde etkili olduğu daha önceki çalışmalarda tespit edilen akrilik ve metakrilik esaslı polimerlerin kalsiyum oksalat kristalizasyonuna etkisi kendiliğinden (spontene) kristalizasyon deneyleriyle incelenmiştir. Akrilik esaslı blok kopolimerler radikal polimerizasyon metodu ile üretilmiştir. Metakrilik esaslı blok kopolimerler ise Max-Planck (Almanya) Enstitüsünden temin edilmiştir. Kristalizasyon deneyleri sırasında CaCl₂ ve Na₂C₂O₄ kullanılmıştır. Bu deneysel çalışmalarda iletkenlik ölçer (Jenway, mod 4020), bilgisayar, pH ölçer cihazı (Nell, mod 821), mekanik karıştırıcı (IKA- WERK, RW 20) ve otomatik kontrollü su banyosu kullanılmıştır. Polimerlerin kristal morfolojisine etkisini gözlemek amacıyla YTU Kimya-Metalurji Fakültesindeki tarama elektron mikroskopundan (SEM) faydalanılmıştır.

Investigation of Hydroxyapatite and Calcium...

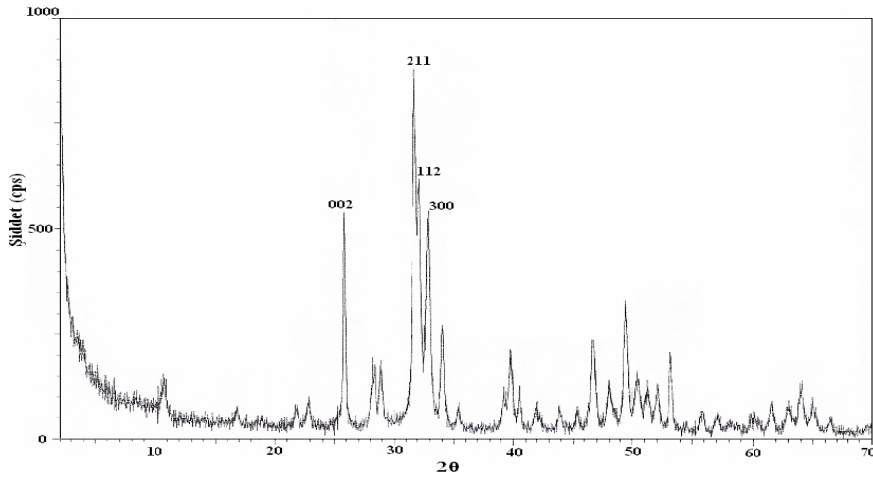
Kalsiyum oksalatın çökme hızına polimerlerin etkisi CaCl_2 ve $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ içeren çözeltinin iletkenliğinin zamanla düşüşüne bağlı olarak hesaplanmıştır. Kristalizasyon deneyleri 1000 ml hacimli bir reaksiyon kabında gerçekleştirilmiş, sıcaklık 37°C 'da sabit tutulmuştur. Kalsiyum oksalatın aşırı doymuş çözeltileri, başlangıç konsantrasyonu $3.25 \cdot 10^{-4}$ M olacak şekilde eşit hacimli CaCl_2 ve $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ çözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edilmiş, polimer etkisinin gözlemlendiği deneylerde aynı yöntem uygulanmış ve polimer çözeltisi $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ çözeltisi ile birlikte reaksiyon kabına konulmuştur.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Hidroksiapatit (HAP) Kristalizasyonu

Önceden üretilen nanometre boyutlu HAP aşırı kristallerinin ve kristal büyümesinin gerçekleştiği deneylerde elde edilen HAP kristallerinin analizleri sonucunda polielektrolitlerin kristal özelliklerine etkisi tartışılmıştır.

Kristalizasyon deneylerinde kullanılmak için aşırı kristal üretilmiş ve X-ışınları ve FTIR analizleri sonucunda HAP (hidroksiapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) olduğu doğrulanmıştır. Elde edilen HAP aşırı kristalinin X-ışınları difraktometre paterni sonuçları Şekil 3.1 ve Çizelge 3.1'de verilmektedir.



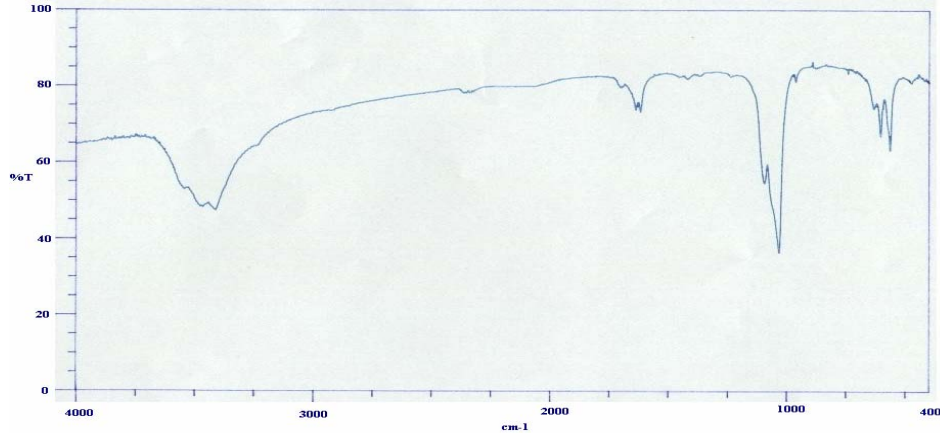
Şekil 3.1. HAP aşırı kristallerinin toz X-ışını Difraktometre Paterni

Çizelge 3.1. HAP aşırı kristallerinin X-ışını difraktometre değerleri

HAP Aşırı Kristali		ASTM (09-0432)	
d	I/II	d	I/II
2.803	100	2.814	100
2.724	60	2.720	60
3.444	50	3.440	40
2.633	27	2.631	25
2.265	23	2.262	20
1.945	29	1.943	30
1.842	35	1.841	40
1.721	21	1.722	20

Şekil 3.2' de HAP aşırı kristalinin FT-IR grafiğinde 3400 cm^{-1} civarında su moleküllerinden kaynaklanan geniş bir pik görülmektedir. Yaklaşık 3570 cm^{-1} civarındaki zayıf

pik ise HAP'in yapısındaki O-H yapısını göstermektedir. 1090 cm^{-1} -1030 cm^{-1} arasında güçlü PO_4^{3-} gerilmesi ve 600-560 cm^{-1} arasında orta şiddette O-P-O bağının üçlü bir deformasyon titreşimi görülmektedir. 1600 cm^{-1} civarında görülen zayıf titreşim CO_3^{2-} gruplarının varlığını gösterir. Bu ortamdaki CO_2^{2-} 'nin tam olarak uzaklaştırılmadığını göstermektedir [3,8].



Şekil 3.2. HAP kristallerinin FTIR Spektrumu

İkinci aşamada aşı kristal varlığında kristal büyütme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Polimer olmaksızın ve polimer varlığında HAP kristalleri elde edilmiştir. Elde edilen kristallerinin yüzey alan analiz sonuçları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Elde Edilen Kristallerin Spesifik Yüzey Alanları

HAP Kristali	Spesifik Yüzey Alanı (m^2/g)
HAP aşı kristali	33±2
Polimer olmaksızın elde edilen HAP kristali (300 dakika sonunda)	26.92±2
2.5 ppm polimer varlığında elde edilen HAP kristali (300 dakika sonunda)	33±2

Bu sonuca göre 300 dakika sonunda katkı maddesi olmadan gerçekleştirilen kristallerin yüzey alanı $((33-26,92)/33)*100=\%18,42$ kadar azalmıştır. Bu da bize aşı kristal yüzeyi üzerinde kristal büyümesi gerçekleştiğini göstermektedir. Polimer varlığında (2,5 ppm) gerçekleştirilen deneylerde 300 dakika sonunda elde edilen kristallerin yüzey alanlarında bir değişiklik görülmemiş, kullanılan aşı kristalin yüzey alanı (33 m^2/g) ile aynı sonuç bulunmuştur. Bu sonuç bize yüzey alanında değişikliğe neden olacak kadar bir kristal oluşum hızı gözlenmediğini göstermiştir.

Tarama Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak yapılan çalışmada (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4), elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Elde Edilen Çubuk Şeklindeki HAP Kristallerin Boyutları ve Enleri

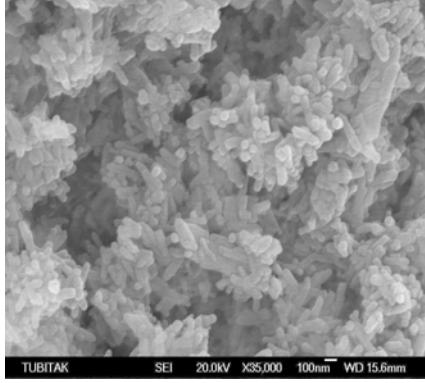
HAP Kristalleri	Boy (nm)	En (nm)
Aşı kristali	191	52
A	293	65
B	200	58
C	191	58

300 dakika sonunda A: çözeltide polimer olmaksızın elde edilen HAP kristali, B: çözeltide 3 ppm poli(etilen glikol-b-akrilik asit) (MA=3700, EO/AA=1,93) polimeri varlığında

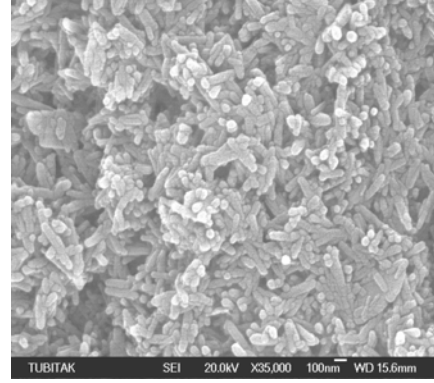
Investigation of Hydroxyapatite and Calcium...

elde edilen HAP kristali, C: çözeltide 3 ppm PAA (poli akrilik asit) (MA=5000) homopolimeri varlığında elde edilen HAP kristalidir.

Bu sonuçlar, HAP aşu kristali üzerinde kristal büyümesinin gerçekleştirildiği deneylerde polimer varlığında elde edilen kristallerin boyutunda küçülme olduğunu göstermektedir. PAA homopolimeri varlığında elde edilen kristallerin boyutunun poli(etilen glikol-b-akrilik asit) polimeri varlığında edilen kristallerin boyutundan daha küçük olduğu görülmüştür. Ayrıca polimerlerin kristal şeklini değiştirmedeği görülmüştür.



Şekil 3.3. HAP aşu kristalleri



Şekil 3.4. 3 ppm poli(etilen glikol-b-akrilik asit) polimeri varlığında oluşan HAP kristalleri (300. dakika)

3.2. Kalsiyum Oksalat Kristalizasyonu

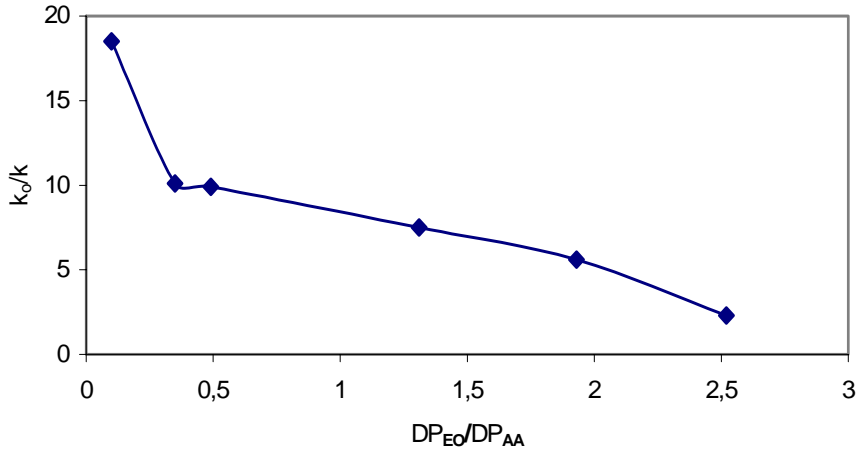
Poliakrilik asit (PAA), Polimetakrilik asit (PMAA), Polietilen glikol (PEG), etilen oksit- blok-akrilik asit (EO-b-AA) ve etilen oksit blok metakrilik asit (EO-b-MAA) kopolimerleri varlığında gerçekleştirilen kristalizasyon deneylerine ait veriler Çizelge 3.3'de özetlenmektedir. Polimer etkinliği k_0/k değerlerine bakılarak değerlendirilmiştir. k_0/k oranı kalsiyum oksalat kristalizasyon hızının (k_0), polimer kullanıldığı zaman ele geçen kristalizasyon hızına (k) oranı olarak alınmıştır. k_0/k oranı kalsiyum oksalat çözeltisinin değerinden büyük olan polimerler kalsiyum oksalat kristalizasyonunu önlemede etkili olan polimerlerdir. Her bir polimer örneği için kristalizasyon deneyi en az iki kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 3.4 incelendiğinde akrilik asit ve metakrilik asit içerikli polimerlerin kalsiyum oksalat kristallerinin büyüme mekanizmasını etkiledikleri görülmüştür. PAA ve PMAA polimerleri ile EO-b-AA ve EO-b-MAA blok kopolimerleri kristalizasyon hızını azaltmıştır. Ayrıca PAA polimeri 8 saat süresince kristalizasyonu engellemiştir. EO-b-MAA kopolimerleri varlığında ise gecikme zamanı görülmüştür. Bu blok kopolimerler gecikme zamanı göstermelerine rağmen k_0/k oranları EO-b-AA blok kopolimerlerinin k_0/k oranlarından daha düşüktür.

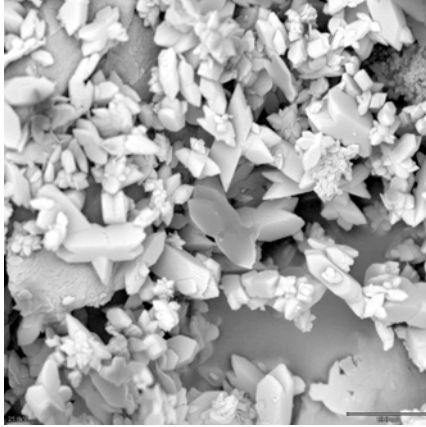
Şekil 3.5 incelendiğinde poliakrilik asit-polietilenoksit blok kopolimerinin PEO/PAA oranı arttıkça k_0/k oranının düştüğü, başka bir deyişle AA asit yüzdesi arttıkça polimer etkisinin arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç polimer içindeki AA bloğunun kristalizasyonu önlemede EO bloğuna oranla daha aktif rol oynadığını göstermektedir. Blok kopolimerlerde asit içeriği arttıkça kristalizasyonu önleme etkisinin artmasının nedeni büyük sayıda negatif yüklü iyonların kristal yüzeyindeki pozitif bölgelerle polar çekimi arttırmasıdır[9].

Çizelge 3.4. 37 °C de ve 1 ppm'de akrilik ve metakrilik asit esaslı polimerlerin kalsiyum oksalatın kristalizasyon hızına etkisi

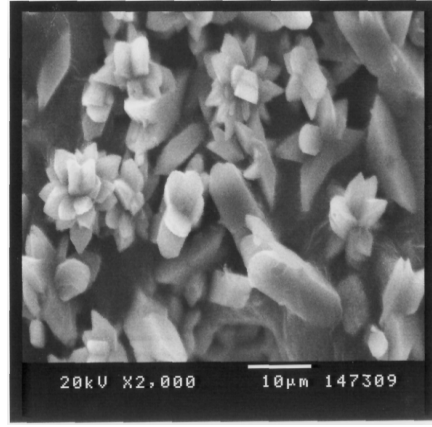
Polimer	MA	DP _{EO} /DP _{AA}	DP _{EO} /DP _{MAA}	t _{ind} (dak)	k ₀ /k
PEG	2000	-	-	-	1.0
EO-b-AA	3300	2.52	-	-	2.3
EO-b-AA	3700	1.93	-	-	5.6
EO-b-AA	4500	1.31	-	-	7.5
EO-b-AA	3300	0.49	-	-	9.9
EO-b-AA	4200	0.35	-	-	10.1
EO-b-AA	3700	0.10	-	-	12.6
PAA	5000	-	-	-	-
EO-b-MAA	21600	-	6	22	2.4
EO-b-MAA	25400	-	1.4	20	3.1
MAA	8000	-	-	25	1.7



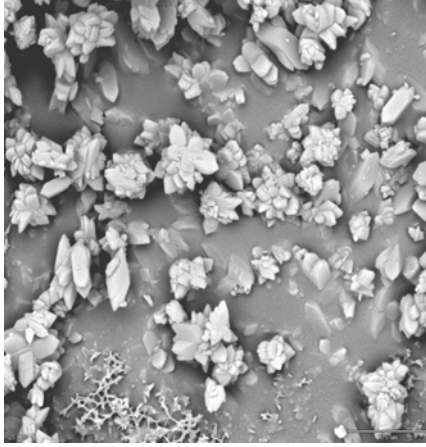
Şekil 3.5. Polimerin PEO/PAA oranının k₀/k oranına etkisi



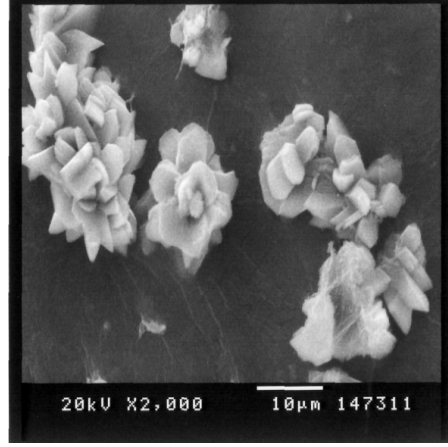
Şekil 3.6. Polimersiz kristal şekli



Şekil 3.7. EO-b-MAA varlığında kristal şekli



Şekil 3.8. EO-b-AA varlığında kristal şekli



Şekil 3.9. PAA varlığında kristal şekli

Tarama Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak polimer katkısı olmadan saf kalsiyum oksalat kristalleri ile 1 ppm’de EO-b-AA, EO-b-MAA ve PAA varlığında oluşan kalsiyum oksalat kristalleri incelenerek karşılaştırılmıştır. Kristallerin SEM resimleri incelendiğinde polimerlerin kristal morfolojisinde değişikliklere neden olduğu görülmüştür. Akrilik esaslı blok kopolimerler aglomerasyonu artırırken metakrilik esaslı polimerlerde aglomerasyonun azaldığı görülmüştür. Ayrıca polimer kullanılması kristal yoğunluğunun azalmasına sebep olmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Kalaiselvi, P., Udayapriya, K.L., Selvam, R., “Uric Acid-Binding Proteins in Calcium Oxalate Stone Formers and Their Effect on Calcium Oxalate Crystallization”, *BJU International* 83, 919-923, 1999.
- [2] Hoyer, J.R., Asplin, J.R., Otsov, L.J.R., “Phosphorylated Osteopontin Peptides Suppress Crystallization by Inhibiting The Growth of Calcium Oxalate Crystals”, *Kidney International*, 60, 77-82, 2001.
- [3] Koutsopoulos, S., “Synthesis ve Characterization of Hydroxyapatite Crystals: A Review Study on The Analytical Methods”, Wiley Periodicals, Inc. 600-612, 2002.
- [4] Taş, A.C., “Synthesis of Biomimetic Ca-Hydroxyapatite Powders at 37°C in Synthetic Body Fluids”, *Biomaterials* 21, 1429-1438, 2000.
- [5] Atanassova, K.Neykov K., Gutzow, I., “ Solubility and Dissolution Kinetics of Calcium Oxalate Renal Calculi in Solutions, Containing DL-lysine: in Vitro Experiments”, *Journal of Crystal Growth*, 212, 233-238, 2000.
- [6] Öner, M., Doğan, Ö., Öner, G., “ The Influence of Polyelectrolytes Architecture on Calcium Sulfate Dihydrate Growth Retardation”, *Journal of Crystal Growth*, 186, 427-437, 1998.
- [7] Addadi, L., Moradien, J., Shay, E., Marauds, N.G., Weiner, S., “A Chemical Model for the Cooperation of Sulfates and Carboxylates in Calcite Crystal Nucleation: Relevance to Biomineralization”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 2732-2736, 1987.
- [8] Gomez-Morales, J., Torrent-Burgues, J., Boix, T., Fraile, J., Rodriguez-Clemente, R., “Precipitation of Stoichiometric Hydroxyapatite by a Continuous Method“, *Cryst. Res. Technol.*, 36(1):15-26, (2001).
- [9] Öner, M., Calvert, P., “Polielektroların Kalsiyum Oksalat Kristalinin Büyüme Hızına Etkisi”, *UKMK-1 Tebliğ Kitabı*, Ankara, 1994, 136-145.