

**KEMİK DOKU İMPLANT MALZEMELERİ:
OSSEOİNTEGRASYON VE ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİK**

**BONE TISSUE IMPLANT MATERIALS:
OSSEOINTEGRATION AND ANTIBACTERIAL EFFECT**

DERYA KALELİOĞLU

Prof. Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2015

DERYA KALELİOĞLU'nun hazırladığı '**Kemik doku implant malzemeleri: osseointegrasyon ve antibakteriyel etlilik**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehlika PULAT

.....

Başkan

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Danışman

.....

Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

09/09/2015

Derya KALELİOĞLU

ÖZET

KEMİK DOKU İMPLANT MALZEMELERİ: OSSEOİNTEGRASYON VE ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİK

Derya KALELİOĞLU

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Eylül 2015, 112 sayfa

Bu çalışma 2210-C TÜBİTAK Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı Desteği ile hazırlanmıştır. Sunulan tez çalışması kapsamında osseointegrasyonu destekleyecek antibakteriyel özelliğe sahip titanyum (Ti) kaplamaların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ti plakalar, osseointegrasyonu sağlayacak hidroksiapatit (HA) partiküllerle işlevselleştirilmiş, antibakteriyel özellikte polietilen oksit fiberler ile kaplanarak, malzeme karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca üretilen plakaların osteojenik ve antibakteriyel etkinlikleri, *in-vitro* hücre kültür çalışmalarıyla incelenmiştir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında kaplama kararlılığının arttırmak ve fiber kaplamalar için geniş yüzey alanı oluşturmak amacıyla, saf ticari Ti plaka (CP Ti) (1x1 cm²) yüzeylerine mekanik ve kimyasal uygulamalar yapılmıştır. İlk olarak Ti plakalar, P280/400 numara zımpara kağıdı ile iki yönlü zımparalanmış, ardından farklı sürelerde %4' lük nitrik asit (HNO₃) uygulaması yapılarak yüzeyde nano boyutta pürüzler oluşturulmuştur. Zımparalanmış ve kimyasal olarak aşındırılmış Ti plakalar, NaOH ve HCl çözeltilerine batırılarak yüzeylerinde titanyum oksit tabakası oluşumu sağlanmıştır. Malzemelerin yüzey özellikleri ve topografisi, profilometre, su temas açısı ve AFM analizleriyle incelenmiştir. Yüzey

uygulamaları ile hem mikron, hem de nano boyutta yapılar oluşturulmuştur. Yüzey uygulamaları sonrasında su temas açısı 84°'den 69°'ye düşmüş ve ıslatılabilirliği daha yüksek bir yüzey oluşumu sağlanmıştır.

Çalışmanın sonraki aşamasında, osseointegrasyonu desteklemek amacıyla biyomimetik yöntemle, yapay vücut sıvısı içerisinde, farklı tip HA partikül üretimi gerçekleştirilmiştir. M-HA ve B-HA partiküller (bor katkılı HA) mikrodalga enerjisi uygulanarak biyomimetik yöntemle, O-HA partiküller ise oda sıcaklığında biyomimetik yöntemle üretilmiştir. Ti plakaların yüzeyleri, elektroçirme ile farklı oranlarda HA partikül içeren, polietilen oksit fiberlerle kaplanmış ve en uygun HA miktarı belirlenmiştir. Nanofiberlerin morfolojileri, HA yerleşim ve dağılımları, TEM ve SEM analizleri ile incelenmiş, fiber çapları, Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır. Analizler, HA partiküllerin fiber yapısını bozmadan fiber içi ve üzerine dağıldığını göstermiştir. Ayrıca HA katkısı sonucunda fiber çaplarında (210±41nm) büyük değişimler gözlenmemiştir.

Ti plakaların osteojenik aktiviteleri, 28 günlük MC3T3-E1 preosteoblast hücre kültür çalışmaları ile incelenmiştir. Mitokondriyal aktivite testi (MTT) sonuçları, HA katkısının hücre yapışmasını desteklediğini ve hücre üremesini PEO fiber kaplı örneklerle göre 2 kat fazla olacak şekilde, logaritmik olarak arttırdığını göstermiştir. HA/PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakaların osteojenik farklılaşma kapasiteleri, ALP aktiviteleri ile belirlenmiş ve HA içeren örneklerin ALP aktivitesinin 28. güne kadar arttığı gözlenmiştir. Osteoblastlara özgü gen ifade seviyeleri (runx2, kollajen tip1, osteokalsin, osteopontin), RT-PCR çalışmaları ile incelenmiştir. Tüm HA içeren örnekler arasında, bor katkılı HA içeren grubun en yüksek gen ifade seviyelerini gösterdiği belirlenmiştir. Hücre kültür çalışmaları ile, HA katkısının, yüzeyde hücre yapışma, çoğalma ve farklılaşma kapasitelerini arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Ti plakaların antibakteriyel etkileri, standart *S. epidermidis* (ATCC12228 ve 35984) bakteri suşları kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan analizler, PEO fiber kaplamaların bakteri yapışmasını belirgin bir şekilde azalttığını, ayrıca O-HA içeren grubun diğer gruplara göre en yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, Ti malzemelerin yüzeylerine yapılan kaplamalarla osseointegrasyonu başarılı bir şekilde destekleyen, öte yandan hücre yapışmasını belirli oranlarda engelleyen implant kaplaması üretilmiştir.

Anahtar kelime: Elektroçirme, poli(etilen oksit), titanyum, implant malzemeleri, hidroksiapatit, yapay vücut sıvısı.

ABSTRACT

BONE TISSUE IMPLANT MATERIALS: OSSEOINTEGRATION AND ANTIBACTERIAL EFFECT

Derya KALELİOĞLU

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

September 2015, 112 pages

This study was prepared with the support of TÜBİTAK, 2210-C National scholarship programme for MSc students. This study aims to improve antibacterial titanium coating which enhanced osseointegration at the same time. Titanium (Ti) substrates covered with antibacterial polyethylene oxide (PEO) fibers which have functionalized with hydroxyapatite (HA) particles to improve osseointegration and their characterization studies were performed. Osteogenic and antibacterial activities of coated Ti plates were examined with in-vitro cell culture analysis.

At the first step of the study, mechanic and chemical treatments were applied to the commercially pure titanium plates (cpTi) (1x1 cm²) to improve coating stability and to form extensive surface area for further fiber coating. First, Ti substrates were grinded with 280/400 grit sandpapers in two directions. Then, they were chemically etched by using 4% HNO₃ which formed nanoscale roughness on Ti surfaces. The polished and etched Ti substrates were immersed into NaOH and HCl solutions to form titanium oxide layer. Material surface properties and topographies were examined with profilometer, AFM and water contact angle measurements. Surface characterizations showed that mechanical and chemical treatments formed micro- and nanoscale features on titanium surfaces. Surface

treatments resulted in contact angle decrease from 84° to 69° which shows that surface hydrophilicity increased.

In the next step, different types of HA particles were used to promote osseointegration which were produced by biomimetic precipitation of concentrated simulated body fluid (SBF). M-HA particles and B-HA particles (boron substituted HA) were produced with biomimetic method supported by microwave irradiation and O-HA particles were produced with biomimetic procedure at room temperature. PEO fibers including different ratios of HA particles were coated on Ti substrates by electrospinning and the most appropriate HA amount was determined. The nanofibers morphology, the HA location and distribution were characterized via using SEM and TEM analysis. Fiber diameters were calculated by using Image J software. The analysis shows that HA nanoparticles were successfully entrapped in PEO nanofibers. Besides, PEO fiber (210±41nm) diameters were approximately same after HA addition.

Osteogenic activities of Ti plates were examined by preosteoblastic MC3T3-E1 cell culture studies. Mitochondrial activity (MTT) assay results showed that HA addition promoted cell adhesion and cell population increased exponentially which was two times more than that of PEO fibers. Osteogenic differentiation capacity of Ti substrates were evaluated by ALP activity and all HA coating fiber's values increased till 28th days. Expression rate of osteoblast specific genes (Runx2, Col1, OCN, OPN) were evaluated by using RT-PCR. Among HA containing fibers, boron substituted HA fibers showed highest gene expressions level. Cell culture studies showed that addition of HA nanoparticles improved cell adhesion, proliferation and differentiation.

The antibacterial effects of coated Ti plates were observed by using *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228 and 35984) bacterial strains. Bacterial adhesion rates showed that, PEO fiber coatings decrease the number of adherent bacteria on Ti plates. The most successful antibacterial effect was provided on O-HA/PEO fiber coated samples.

This study shows that protein and cell adhesion resistant PEO polymer coatings are functionalized efficiently with hydroxyapatite nanoparticles and this coating supporting osseointegration.

Keywords: Electrospinning, poly(ethylene oxide), titanium, implant materials, hydroxyapatite, simulated body fluid.

TEŞEKKÜR

Beni grubuna kabul ederek tez çalışmalarımın yürütülmesi için gerekli tüm desteği bana sağlayan, engin bilgi birikimiyle ufkumu genişleten, beni yetiştiren, her zaman örnek alacağım sevgili ve çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**'na bu zor ve yoğun dönemde sevgi ve desteğini benden esirgemediği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı ile maddi olarak destek sağlayan **TÜBİTAK**'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans dönemimde olduğu gibi tez çalışmalarım da bana kapılarını sonuna kadar açan sevgili hocam **Prof. Dr. Nuran Diril**'e, arkadaş ve dostluklarının yanı sıra bana her zaman yol gösteren akıl hocalarım **Fatma Zilifdar** ve **Egemen Foto**'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde büyük emeği olan, beni sürekli motive eden ve tecrübeleri sayesinde bilimsel anlamda pek çok şey öğrendiğim, **Dr. Murat Şimşek**, **Dr. Anıl Sera Çakmak** ve **Farzin Sana**'ya hep yanımda oldukları için teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan çok zevk aldığım, sorularımı asla cevapsız bırakmayan, her şeyden önce büyük bir ailenin, mutlu bir çalışma ortamının nasıl olduğunu bana gösteren **Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş**, **Dr. Soner Çakmak**, **Tuğrul Tolga Demirtaş**, **Damla Çetin Altında**, **Merve Çapkın Yurtsever**, **Özge Ekin Tunçay**, **Gökçe Kaynak** ve tüm **Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu**'na teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman özlemlerle hatırlayacağım, yanlarında olmaktan çok mutlu olduğum, bir bardak kahvenin yanında, dostluk, sevgi, içtenlikleri ve her şeye rağmen gülen yüzleriyle, stresli dönemleri güzel anılara çeviren, **Meryem Sümeyye Akdemir**, **Tuğçe Gültan**, **Aysu Arslan**, **Bedriye Topal**, **İnci Shikhaliyeva**, **Ebru Tamahkar**, **Şeyma Bektaş**'a biricik **KAHVE ÇETESİ**'ne teşekkürlerimi sunarım.

En yoğun ve zor zamanlarımda bana yol gösteren her şeyden öte dostlarım diyebileceğim her zaman yanımda olmalarını istediğim sevgili arkadaşlarım **Gülseren Irmak** ve **Nur Merve Kazaroğlu**'a teşekkürlerimi sunarım.

En yoğun zamanımda karşıma çıkan, sıkıntılarımı bir sözle unutturup güldüren ve sevinçlerimi güzel gülüşüyle daha da büyüten, her zaman yanımda olmasını istediğim canım **Egemen Ergül**'e teşekkürlerimi sunarım.

Bana maddi manevi desteklerini asla esirgemeyen, benle üzüldüğümde benle sevdiğim, başarılarımla gururlanan, her zaman destek aldığım canımın içi kardeşim **Deniz Kalelioğlu**'na, güzeller güzeli tatlı annem **Cavidan Kalelioğlu**'na ve biricik canım babam **Erol Kalelioğlu**'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER.....	ix
ÇİZELGELER	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Biyomedikal İmplantlar	4
2.1.1. Titanyum İmplantlar.....	7
2.1.2. Titanyum İmplantların Yüzey Özellikleri ve Hücre Yapışmasına Etkisi	11
2.1.3. Titanyum İmplant Kaynaklı Sorunlar	14
2.1.3.1. Kemik oluşumu ve osseointegrasyonun sağlanamaması	16
2.1.3.2. İmplant kaynaklı enfeksiyon oluşumu	17
2.1.4. Titanyum İmplantların Yüzey Modifikasyonu	20
2.1.5. Titanyum İmplant Yüzey Kaplamaları.....	22
2.1.5.1. Antibakteriyel yüzey kaplamaları	22
2.1.5.2. Osseointegrasyonu arttıran yüzey kaplamaları	25
2.2. Polietilen Oksit.....	28
2.2.1. Polietilen Oksitin İmplant Malzemelerinde Kullanımı	29
2.2.2. Titanyum İmplantlarda Polietilen Oksit Yüzey Kaplamaları	30
2.3. Hidroksiapatit.....	32
2.3.1. İmplant Malzemelerinde Hidroksiapatitin Kullanımı	33
2.3.2. İyon Katkılı Hidroksiapatitler	34
2.3.2.1 Bor katkılı hidroksiapatit.....	35

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR	37
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	37
3.2. Titanyum İmplant Malzemelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	38
3.2.1. Titanyum Malzemelerinin Yüzey Hazırlıklarındaki Ön İşlemler	38
3.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi	39
3.2.3. Su Temas Açısı Ölçümleri	39
3.2.4. Pertometre Analizi.....	40
3.2.5. Ti malzeme yüzeyinde HA oluşumu	40
3.3. Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu	40
3.3.1 Mikrodalga Destekli Biyomimetik Yöntemle HA Partiküllerin Üretimi	41
3.3.2. Mikrodalga Destekli Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı HA Partiküllerin Üretimi.....	41
3.3.3 Biyomimetik Yöntemle Oda Sıcaklığında HA Partiküllerin Üretimi	42
3.4 Titanyum İmplant Malzemelerinin HA İçeren PEO Nano-fiberlerle Kaplanması ve Karakterizasyonu.....	42
3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	43
3.4.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	43
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	44
3.5.1. MTT Analizi	44
3.5.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	45
3.5.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizleri	45
3.5.4. Alkalin Fosfataz (ALP) Analizi	48
3.5.5. İstatistiksel Analiz.....	48
3.6. Antibakteriyel Etkinin Belirlemesine Yönelik Çalışmalar.....	48
3.6.1. Yapışma Analizi	49
4.DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI.....	50
4.1 Titanyum İmplant Malzemelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	50

4.1.1. Titanyum İmplant Malzeme Yüzey Hazırlıklarındaki Ön İşlemler.....	51
4.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi	52
4.1.3 Pertometre Analizi.....	55
4.1.4 Su Temas Açısı Ölçümleri	55
4.1.5. Ti malzeme yüzeyinde HA oluşumu	56
4.2. Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Partiküllerin Üretilmesi	58
4.2.1. Oda Sıcaklığında Biyomimetik Yöntem ile Hidroksiapatit Partiküllerin (O-HA) Üretilmesi	58
4.2.2 Mikrodalga Destekli Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Partiküllerin Üretilmesi	59
4.2.3. Mikrodalga Destekli Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Hidroksiapatit Partiküllerin (B-HA) Üretilmesi	60
4.3 Titanyum İmplant Malzemelerinin HA/PEO Nano Fiberlerle Kaplanması ve Karakterizasyonu.....	61
4.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	64
4.3.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	68
4.4 Hücre Kültürü Çalışmaları	70
4.4.1. MTT Analizi	71
4.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	73
4.4.3. Alkalin Fosfataz (ALP) Analizi	80
4.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	81
4.5. Antibakteriyel Etkinin Belirlemesine Yönelik Çalışmalar.....	88
5.GENEL SONUÇLAR	95
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ.....	112

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Biyomalzemelerin vücuttaki kullanım yerleri [1].	5
Şekil 2.2. Çeşitli Ti alaşımlarının kemikle karşılaştırılmalı elastisite modülleri (CP Ti: Saf Ti, CP Ta: Saf Tantalum, ST: Çözelti uygulanmış, solution treated, Aged: yaşlı).	8
Şekil 2.3. Farklı sitokiyometrilere sahip titanyum oksit kristalin faz yapıları [17].	9
Şekil 2.4. Titanyum oksit tabakasının bileşimi [19].	11
Şekli 2.5. Nano boyutta pürüzlülüğün protein yapışması, hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşmasına etkisi. a) nanoboyuta yapılar içermeyen yüzey, b) nanoboyutta yapılar içeren yüzeyler [29].	13
Şekil 2.6. Biyofilm oluşumu. Faz I. Bakterilerin malzeme yüzeyine geri dönüşümlü olarak yapışması (docking stage), Faz II. Bakterilerin malzeme yüzeyine geri dönüşümsüz olarak yapışması (locking stage), Ekzopolisakkarit üretimi (Biyofilm oluşumu) (s:saat).	19
Şekil 2.7. Polietilen oksit sentezi.....	28
Şekil 2.8. a) PEO'nun kimyasal yapısı, b) (MA:400, 600, 3350 g mol ⁻¹) ve c) Molekül ağırlıklarına göre değişen PEG/PEO polimerinin fiziksel görünümleri (MA: 600000 g mol ⁻¹) [79].	28
Şekil 2.9. PEG kaplanmış Ti substratlara protein ve hücre yapışması, a)Boş Ti yüzey, b) Polietilen glikol ile kaplanmış yüzey, b) Hücre yapışmasını destekleyen, biyomoleküllerle modifiye edilmiş PEG ile kaplanmış yüzey.	31
Şekil 2.10. Saf HA kristal yapısı.....	32
Şekil 3.1. Titanyum plakaların zımparalanma yönleri, a) ilk zımparalama yönü, b) ikinci zımparalama yönü.....	39
Şekil 4.1. Zımparalama sonrası asitle muamele edilmiş ve NaOH/HCl uygulaması yapılmış Ti plakaların AFM görüntüleri a) 1 dk HNO ₃ uygulaması, b) 5 dk HNO ₃ uygulanması, c) 10dk HNO ₃ uygulaması. Sol taraftaki fotoğraflar 2 boyutlu, sağ taraftaki fotoğraflar ise 3 boyutlu görüntülere aittir.	54

Şekil 4.2. Ön işlem uygulanmış ve yüzeyi SBF ile HA kaplanmış Ti plaka SEM görüntüleri, a)18 sa HA kaplama, 2,000X, b) 24 sa HA kaplama, 2,000X, c) 2x18 sa HA kaplama, 2,000X, d) 3x18 sa HA kaplama, 2,000X.	57
Şekil 4.3. Gibbs enerjisi seviyesinin düşmesiyle oluşan Ca/P fazları ve oluşum yolları [135].	60
Şekil 4.4. PEO'in foto-çapraz bağlayıcı PETA ile çapraz bağlanması [140].	62
Şekil 4.5. PEO fiberlerle yüzeyleri kaplanmış olan Ti plakalar a) Yüzey uygulamaları yapılmamış Ti, b) Ön işlemler uygulanmış Ti, c) PEO fiberlerle kaplanmış Ti, d) Mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti (M-HA/PEO/Ti), e) Bor katkılı HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti (B-HA/PEO/Ti), f) Oda sıcaklığında üretilmiş HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti (O-HA/PEO/Ti).....	64
Şekil 4.6. Ti yüzey üzerine kaplanmış PEO fiberlerin, a) SEM görüntüsü, (5,000x), b) Çap dağılım grafiği.	64
Şekil 4.7. Ti yüzeyler üzerine kaplanan, HA içeren PEO fiberlerin SEM görüntüleri ve çap dağılım grafikleri. a) %20 (w/w) oranında B-HA içeren fiberler, (5,000X), b)%20 (w/w) oranında M-HA içeren fiberler, (5,000X), c) %20 (w/w) oranında HA içeren fiberler, (5,000X).....	66
Şekil 4.9. %20 (w/w) oranında mikrodalga desteği ile üretilmiş, bor katkılı HA içeren PEO fiber (B-HA/PEO) TEM görüntüleri. Ölçek boyutları, a) 500 nm, b) 500 nm, c) 200nm, d) 1µm, kırmızı oklar fiber içerisine hapsedilmiş B-HA partikülleri göstermektedir.....	68
Şekil 4.10. %20 (w/w) oranında mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiber (M-HA/PEO) TEM görüntüleri. Ölçek boyutları, a) 200nm, b) 100nm, c) 500nm, d) 500nm.	69
Şekil 4.11. %20 (w/w) oranında oda sıcaklığında üretilmiş HA içeren PEO fiber (O-HA/PEO) TEM görüntüleri. Ölçek boyutları, a) 500 nm, b) 500 nm, c) 200 nm, d) 1µm.....	70
Şekil 4.12. Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği. İstatistiksel anlam	

farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur); # p<0.05, ## p<0.01, ### (PEO/Ti kontrol grubudur).	71
Şekil 4.13. Ti plakaların (Ti) yüzeylerinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerinin 7. gün (a,b,c,d) ve 28. gün (e,f,g,h) SEM görüntüleri. (a) 2,000X, (b) 5,000X, (c) 2,000X, (d) 5,000X, (e) 2,000X, (f) 10,000X, (g) 2,000X, (h) 5,000X. (a, e) Kırmızı oklar MC3T3 hücrelerin sitoplazmik uzantılarını göstermektedir. (f) Kırmızı ok hücre dışı matris katmanlarını işaret etmektedir.	74
Şekil 4.14. PEO ile kaplı Ti (PEO/Ti) plakaların üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin (a) 3. gün , (b) 14. gün SEM görüntüleri. (a, b) 5,000X.	75
Şekil 4.15. (a) Mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiberler ile kaplanmış Ti plakaların (M-HA/PEO/Ti) SEM görüntüsü, 2,000X. (b, c ve d) (M-HA/PEO/Ti) üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin 7.gün SEM görüntüleri. (b, c) 2,000X, (d) 5000X. Kırmızı oklar M-HA partikül kümelerini işaret etmektedir.	75
Şekil 4.16. Mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiberler ile kaplanmış Ti plakaların (M-HA/PEO/Ti) üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin 28.gün SEM görüntüleri. (a) 2,000X, (b)10,000X, (c) 2,000X, (d) 5,000X, (e) 5,000X, (f) 10,000X.....	76
Şekil 4.17. a) Ti plakaların 28.gün hücre kültürü SEM görüntüsü, (2,000X). b) M-HA/PEO/Ti plakaların 28.gün hücre kültürü SEM görüntüsü, (2,000X).....	77
Şekil 4.18. Mikrodalga desteği ile üretilmiş bor katkılı HA içeren PEO fiberler ile kaplanmış Ti plakaların (B-HA/PEO/Ti) yüzeylerinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerinin (a,b,c,d) 7 ve (e,f,g,h) 28. gün SEM görüntüleri. (a) 2000, (b) 5000X, (c) 5000X, (d) 10000, (e) 2000X, (f) 5000X, (g) 10000X, (h) 15000X. Kırmızı oklar B-HA partikül kümeleri üzerinde çoğalan hücre tabakalarını göstermektedir.	78
Şekil 4.19. Oda sıcaklığında üretilmiş HA içeren PEO fiberler ile kaplanmış Ti plakaların (O-HA/PEO/Ti) yüzeylerinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerinin (a,b, c, d) 7 ve (e,f,g,h) 28. gün SEM görüntüleri. (a) 2,000X, (b) 5,000x, (c) 5,000X, (d) 15,000X, e) 2,000X, (f) 5,000X, (g) 5,000X, (h) 15,000X. (f) Kırmızı oklar, hücre dışı matris tabakalarını göstermektedir. (h) Kırmızı oklar, hücrelerin ürettiği kollajen fiberleri işaret etmektedir.....	79

Şekil 4.20. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait ALP grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur).	80
Şekil 4.21. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait KOL-1 gen ifadesi grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur); # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 (B-HA/PEO/Ti kontrol grubudur) ; + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001 (M-HA/PEO/Ti kontrol grubudur).	83
Şekil 4.22. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait Runx2 gen ifadesi grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur).	84
Şekil 4.23. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait OCN gen ifadesi grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur); # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 (B-HA/PEO/Ti kontrol grubudur).	86
Şekil 4.24. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait OPN gen ifadesi grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur); # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 (B-HA/PEO/Ti kontrol grubudur) ; + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001 (M-HA/PEO/Ti kontrol grubudur).	87
Şekil 4.25. <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228), biyofilm(-) ve <i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984), biyofilm(+) suşlarının; Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti yüzeyler üzerindeki tutunma grafikleri. İstatistiksel anlam farklılığı, n=4 * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur); # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 (PEO/Ti kontrol grubudur) ; ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001 (B-HA/PEO/Ti kontrol grubudur); + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001-M-HA/PEO/Ti kontrol grubudur).	89
Şekil 4.26. <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228), biyofilm(-) ve <i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984), biyofilm(+) suşlarının; Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti gruplarında yağışma analizi hücre koloni görüntüleri. (12228 bakteri suş gruplarının sulandırma katsayısı 1:10), (35984 suş gruplarının sulandırma kat sayısı 1:200).	91

Şekil 4.27. *S. epidermidis* (ATCC 12228), biyofilm(-) ve *S. epidermidis* (ATCC 35984), biyofilm(+) suşlarının; Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti yüzeyler üzerindeki yüzde tutunma grafikleri. 91

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Vücutta kullanılan biyomazemeler ve genel özellikleri.	6
Çizelge 2.2. Saf Ti'nin kimyasal bileşimi (%ağırlık).....	9
Çizelge 2.3. İmplant başarısızlıklarına neden olan durumlar [2].	15
Çizelge 2.4. Titanyum implant malzemelerine uygulanan yüzey modifikasyonları	20
Çizelge 2.5. İmplant malzemelerine uygulanan enfeksiyon önleyici yüzey kaplamaları	23
Çizelge 2.6. Osseointegrasyonu arttıran yüzey kaplamalarının sınıflandırılması [71].	26
Çizelge 2.7. Titanyum implantlara CaP kaplama yöntemleri [74].	33
Çizelge 3.1. 10xSBF çözelti reçetesi (Toplam hacim 1L)	41
Çizelge 3.2. Ti plakaların HA içeren PEO fiberlerle kaplama koşulları.	43
Çizelge 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.	47
Çizelge 4.1. Zımparalama sonrası asitle muamele edilmiş ve NaOH/HCl uygulaması yapılmış Ti plakaların pürüzlülük değerleri.	53
Çizelge 4.2. Ön uygulamaları yapılmış olan Ti plakaların pürüzlülük değerleri. ...	55
Çizelge 4.3. Ti plakaların su temas açısı ölçümleri	56
Çizelge 4.4. Farklı oranlarda HA içeren, PEO fiberlerin ortalama çap değerleri....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikro
α	Alfa
β	Beta
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum Klorür Dihidrat
CO_2	Karbon Dioksit
H_3BO_3	Borik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HNO_3	Nitrik Asit
KCl	Potasyum Klorür
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum Klorür Hekzadihidrat
Na_2HPO_4	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat
NaHCO_3	Sodyum Bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
Ti	Titanyum
TiO_2	Titanyum Dioksit

Kısaltmalar

α -MEM	Minimum Essential Medium Alpha Modification
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ACP	Amorf Kalsiyum Fosfat
ALP	Alkale Fosfataz
B-HA	Bor katkılı Hidroksiapatit
Ca/P	Kalsiyum Fosfat
cDNA	Komplementer Deoksi Ribonükleik Asit
cfu	Koloni Oluturan Birim
CP Ti	Ticari Saf Titanyum
DCDP	Dikalsiyum Fosfat Dihidrat

DCP	Dikalsiyum Fosfat Anhidröz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Deoksinükleozid Trifosfat
ECM	Hücre Dışı Matris
EDX	Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektrometresi
FBS	Fötal Sığır Serumumu
HA	Hidroksiapatit
HMDS	Hekzametildisilazan
KOL-I	Kollajen Tip I
MC3T3-E1	Fare Osteoblast Hücre Hattı
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür
nHA	Nano-Hidroksiapatit
OCN	Osteokalsin
OPN	Osteopontin
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PEO	Polietilen Oksit
PETA	Pentaeritritol Triakrilat
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Runx2	Runt-ilişkili Transkripsiyon Faktörü 2
SBF	Yapay Vücut Sıvısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCP	Trikalsiyum Fosfat
TCPS	Hücre Kültür Kabı
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu

1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Dünyada yaşlı nüfusunun artışı, çeşitli nedenlerden dolayı meydana gelen kazalar ve kalıtsal bozukluklar, biyomalzemelerin önemini ve uygulama alanını arttırmaktadır. Biyomalzemeler, iskele ya da implant yapımında kullanılan, eksik veya hastalıklı biyolojik yapıların işlev ve eksikliklerini tamamlamak için kullanılan doğal ya da yapay malzemelerdir. Biyomalzeme biliminde çok büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, vücuttaki her parçanın yapay bir implantla değiştirilebilme imkânı bulunmamaktadır. Dolayısıyla günümüzde medikal uygulamalarda halen aşılamamış sorunlar vardır. Bunların çözümünde biyomekanik, biyomedikal ve doku mühendisliği, alternatif yaklaşımlar sunmaktadır. Özellikle nanoteknoloji, bilişim teknolojileri ve fabrikasyon yöntemlerindeki gelişmelere paralel olarak biyomalzemelerin sağlıklı ve ekonomik olarak kullanılabilmesi ve daha mükemmel biyomalzemelerin üretilmesi yönünde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler oluşturmayan, yani biyouyumlu doğal veya sentetik biyomalzemeler implant malzemeleri olarak kullanılmaktadır [1]. Kemik deformasyonu sonucunda oluşan hastalıkların tedavisinde implant malzemesi olarak metalik titanyum malzemeler tercih edilmektedir [2]. Titanyum (Ti) implant malzemeleri, vücut içersinde istenilen mekanik özellikleri karşılayabilmektedirler. Ancak implant kaynaklı enfeksiyon oluşumu ve implant malzemesinin kemikle bütünleşmemesi gibi implant ve canlı doku arasında bir takım uyumsuzluklar oluşması, Ti implantların önemli dezavantajları arasındadır. Klinikte karşılaşılan sorunların engellenmesi için implant malzemelerinin yüzeylerine çeşitli modifikasyonlar uygulanmaktadır. Bunlar arasında bakteri yapışmasını engelleyen ve osseointegrasyonu arttıran çeşitli yüzey kaplamaları sayılabilir [3].

Polietilen oksit (PEO); amfifilik, suda ve bazı organik çözücülerde çözünebilen, bakteri ve protein yapışmasına karşı doğal dirençli bir poliesterdir. PEO yapısal zincirlerinin oluşturduğu sterik itme ve hidrofilik özelliğinden kaynaklanan ozmotik itme etkileriyle malzeme ve vücut sıvıları arasında bariyer görevi görerek protein, hücre ve bakteri yapışmasını engeller. PEO ve türevleri, malzeme yüzeyine antibakteriyel özellik kazandırarak, implant kaynaklı enfeksiyon oluşumlarını engellemek amacıyla, implant malzemelerinin yüzey modifikasyonlarında

kullanılmaktadır [4]. PEO ve türevleri hücre yapışmasını da engellemeleri nedeniyle, osseointegrasyonun sağlanması için tek başına yeterli olmamaktadır. Bu sorunu aşmak için çeşitli biyoaktif, doğal veya sentetik malzemeler sinyal molekülleri ile işlevselleştirilerek kaplama malzemesi olarak kullanılabilir [5, 6].

Hidroksiapatitler, implant kaplamalarında yumuşak doku ile implant arasında bir ara yüzey oluşturarak bağlanmanın artırılması ve lokal hasarların kapatılması için dolgu malzemesi olarak sıklıkla kullanılan biyoseramiklerdir [7]. Hidroksiapatitler zayıf mekanik özellikleri nedeniyle osseointegrasyonu arttırmak amacıyla diş ve ortopedik implant uygulamalarında kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda hidroksiapatit (HA) kaplanmış olan malzemelerin kemik rejenerasyonunu desteklediği gösterilmiştir [8]. HA üretim yöntemleri arasında, **“biyomimetik yöntem”** doğal kemik yapısına en yakın HA üretiminin gerçekleştirilmesine olanak sağlaması nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Ayrıca HA'in biyoaktif davranışını geliştirmek, yığın özelliklerini ve mekanik özelliklerini değiştirmek amacıyla iyon katkılı HA'ler üretilmektedir. Bor katkılı hidroksiapatitlerin kemik oluşumunu desteklediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [9, 10].

Sunulan bu tez çalışması ile biyomedikal implant malzemesi olarak kullanılan titanyum malzemelere, hem antibakteriyel, hem de osseointegrasyonu destekleyecek özellik kazandırılması için uygun bir yüzey kaplama yaklaşımı geliştirilmesi ve böylelikle klinikte karşılaşılan bir takım problemlerin aşılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, osseointegrasyonun desteklenmesini sağlamak için 10 kat konsantre sentetik vücut sıvısı (10xSBF) kullanılarak biyomimetik yöntemle HA partikül üretimi gerçekleştirilmiştir. Titanyum implant malzemelerinin yüzeyleri, HA partiküller ile işlevselleştirilmiş PEO nanofiberlerle kaplanarak, antibakteriyel etkinlik elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışma dahilinde 10xSBF'den mikrodalga desteğiyle HA ve bor katkılı hidroksiapatit (B-HA) üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 10xSBF'den oda sıcaklığında HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen HA'ler yüzey kaplamalarında kullanılarak osseointegrasyona etkileri karşılaştırılmıştır.

Hazırlanan HA/PEO kaplanmış titanyum plakların osteojenik potansiyeli, kemik öncülü hücre hattı olan MC3T3-E1 hücreleriyle incelenmiş, bu malzemelerin kemik

doku oluşturma etkinliği çeşitli analizler ile belirlenmiştir. Ayrıca HA/PEO kaplanmış Ti plakların antibakteriyel etkinlikleri, *Staphylococcus epidermidis* suşları kullanılarak bakteri yapışma ve biyofilm oluşturma potansiyelleri incelenmiştir.

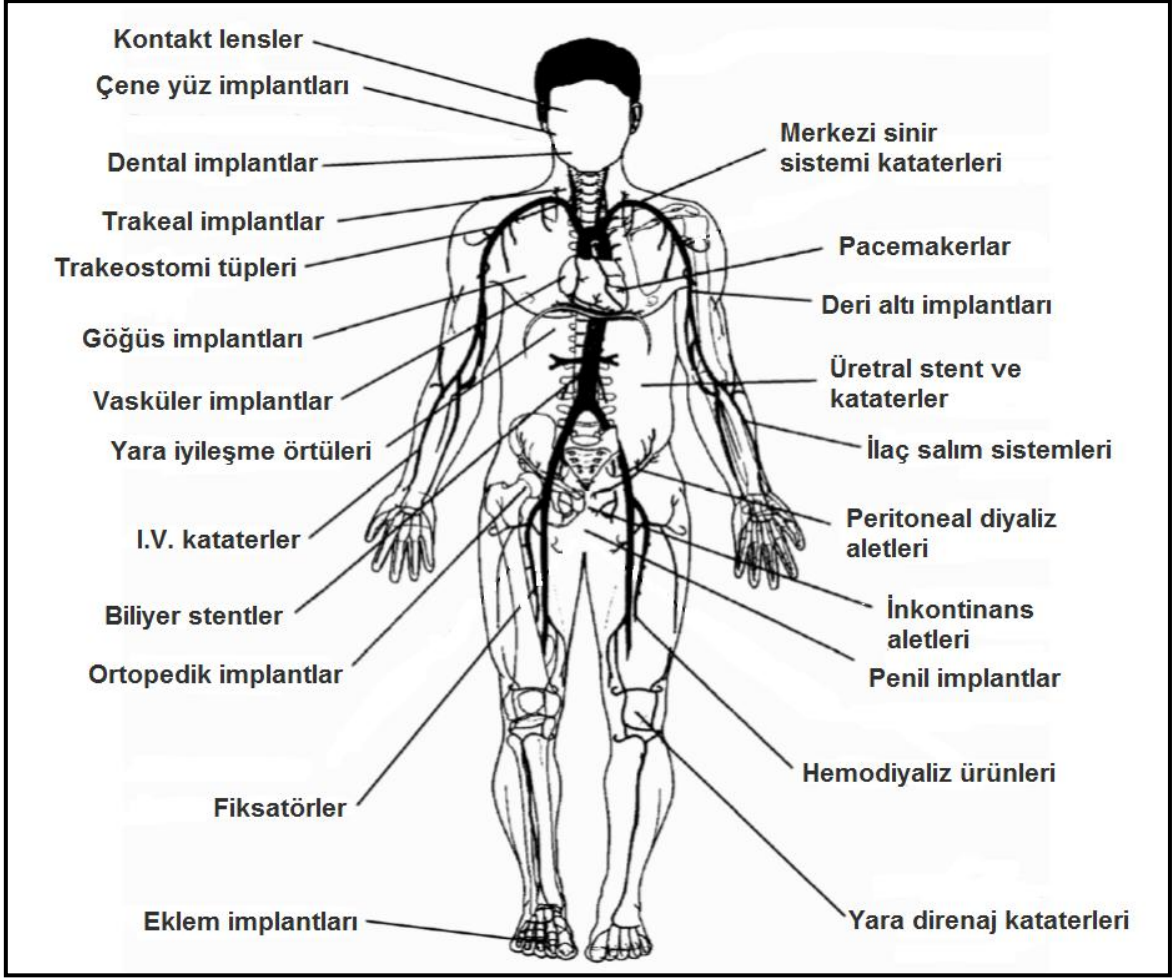
2.GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışmasının temelini oluşturan literatür bilgileri özetlenmiştir. İlk bölümde biyomedikal implantlar hakkında kısaca bilgi verilmiştir. Ayrıca tez çalışma kapsamında kullanılan titanyum implant malzemelerinin özellikleri, titanyumun implant malzemesi olarak kullanımı, neden olduğu sorunlar ve bu sorunları aşmak için uygulanan yüzey modifikasyonlarına yer verilmiştir. İkinci bölümde, antibakteriyel kaplama olarak kullanılacak olan PEO polimeri, kullanım alanları ve kaplama malzemesi olarak etkilerinden bahsedilmiştir. Ardından yine tez çalışması kapsamında kullanılan implant malzemelerinin kemik bütünleşmesini destekleyecek olan hidroksiapatit üretim yöntemleri ve iyon katkılı HA'ler hakkında temel literatür bilgileri verilmiştir.

2.1. Biyomedikal İmplantlar

Çeşitli kaza, travma, hastalıklar sonucunda doku ve organların işlevlerini kaybetmesi, insan yaşam kalitesi ve standartlarını önemli derecede etkilemektedir. Uygulanan geleneksel tedavi yöntemleri olan otogreft, allogreft, zenogreft uygulamalarının yetersiz kalması sonucunda, işlevini kaybetmiş olan dokuları taklit edebilecek biyomalzemelere ihtiyaç duyulmaktadır [11]. **Biyomalzemeler**, insan vücudundaki organ ya da dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla kullanılan malzemeler olup vücut içerisinde çeşitli fizyolojik ve mekanik etkilere maruz kalmaktadırlar [12]. Biyomalzemelerin seçimi ve tasarımı, planlanan medikal uygulamanın türüne göre belirlenir. Yeni malzemelerin tasarımı, malzeme bilimi ve mühendisleri, biyomedikal mühendisleri, patoloji uzmanlarının ve klinik tedavi uzmanlarının işbirliği ile gerçekleştirilir.

Yapay biyomalzemeler; insan vücudunun farklı bölgelerinde, yapay kalp kapakları, kan damarlarında stent, omuz, diz, kalça, bilek, kulak, dental protez olarak kullanılabilir [1].



Şekil 2.1. Biyomalzemelerin vücuttaki kullanım yerleri [1].

İmplant malzemelerinin insan vücudunda etkin bir biçimde kullanımını sağlamak için bazı özelliklere sahip olması gerekir;

- **Mekanik özellikler:** Spesifik uygulamalarda kullanılmak üzere seçilen malzemelerin sertlik, çekme dayanımı, elastisite modülü ve uzama gibi mekanik özellikleri, kullanılacak malzemenin tipini belirler. Biyomedikal uygulamalarda, mekanik özellikleri uygulanacak dokuya yakın olan malzemeler tercih edilir.
- **Biyouyumluluk:** Biyomedikal uygulamalarda kullanılacak olan malzemelerin toksik olmaması, insan vücudunda herhangi bir alerjik reaksiyona veya yangıya neden olmaması beklenir. Biyomalzemenin başarısı, insan vücudunun implanta karşı gösterdiği reaksiyona bağlıdır. Gösterilen tepki biyomalzemenin biyoyuymuluğunu belirler.

- **Yüksek korozyon ve aşınma dayanımı:** Düşük korozyon ve aşınma dayanımına sahip olan malzemeler, vücut sıvıları içerisinde çevre dokulara uyumsuz metal iyonlarının salımına sebep olurlar. Bu iyonlar çevre dokularda birikerek alerjik ve toksik reaksiyonlara neden olurlar.
- **Osseointegrasyon:** İmplantın başarısı için malzeme yüzeyinin çevre kemik doku ile bütünleşmesi çok önemlidir. İmplant yüzeyinin komşu kemik doku veya diğer dokularla entegre olmasındaki yetersizlikler implantın kaybına neden olur. Malzemenin yüzey kimyası, pürüzlülüğü ve topografisi osseointegrasyonda önemli rol oynar [13].

Biyouyumluluğu yüksek olan malzemeler metalik, seramik, polimerik ve kompozit biyomalzemeler olarak 4 grup altında toplanmaktadır [1]. Biyomalzemelerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.1’de incelenmiştir.

Çizelge 2.1. Vücutta kullanılan biyomazemeler ve genel özellikleri.

Malzemeler	Avantaj	Dezavantaj	Örnek
Polimerler (Naylon, silikon, kauçuk, poliester, politetrafloroetilen)	-Esnek -Üretimi kolay	-Sağlam değil, -Zamanla deforme olur -Bozunabilir	-Yumuşak dokular -Kan damarları -Kalça soketleri -Burun -Kulak -Dikiş ipliği
Metaller (Ti ve Ti alaşımları, Co–Cr alaşımları, Au, Ag paslanmaz çelik, vb.)	-Kuvvetli -Sert -Sünek	-Korozyona uğrayabilir -Yoğun -Şekil verilmesi zor	-Eklem protezleri -Dental implantlar -Kalp pilleri -Dikiş telleri -Kemik plakları -Kemik vidaları
Seramik (alümina zirkonya, hidroksiapatit, biyoaktif cam)	-Son derece biyouyumlu -Korozyona ve aşınmaya karşı dayanıklı -Hafif	-Kırılgan -Esnek olmayan, -İşlenmesi zor -Düşük mekanik dayanıma sahip	-Dental implantlar -Ortopedik implantlar
Kompozitler (karbon–karbon, tel ya da fiber ile desteklenmiş kemik çimentosu)	-Kuvvetli -Özel olarak tasarlanabilir	-Üretimi zor	-Kemik çimentosu -Dental reçine

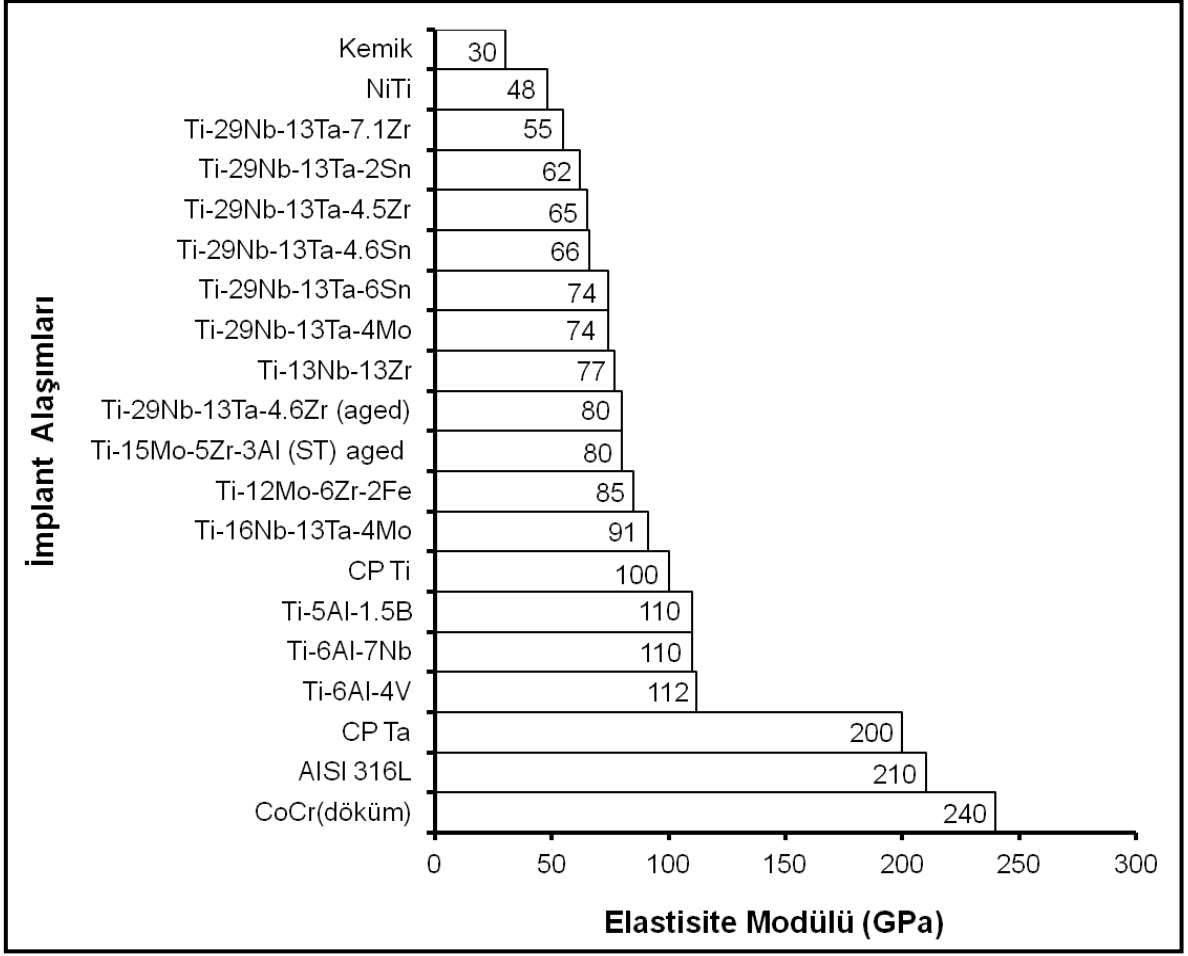
Diş ve ortopedik implantlar gibi yük taşıyan uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler, vücut içerisinde üstün korozyon direncine, yüksek kuvvet/düşük modülüs kombinasyonuna, yüksek yorulma ve aşınma direncine ve yüksek

süneliğe sahip olmalıdır. Ayrıca vücut içerisinde kullanılacak tüm biyomalzemeler mükemmel biyoyuma sahip olmalı ve sitotoksik olmamalıdır. Metalik malzemeler kristal yapıları ve sahip oldukları güçlü metalik bağlar nedeniyle üstün mekanik özelliklere sahiptir. Bu nedenle paslanmaz çelik, kobalt krom alaşımları ve titanyum, titanyum alaşımları gibi metalik malzemeler implant malzemesi olarak tercih edilmektedir. Ancak uzun süreli kullanımlarda bu malzemelerin kemiğe göre yüksek modülüs değerlerine sahip olması, aşınma ve korozyon dirençlerinin düşük olması ve biyoyumluluklarının yeterli olmaması nedeniyle bazı sorunlar yaşanmaktadır [14].

Yapılan çalışmalarda uzun süreçlerde veya ömür boyu kullanıma uygun, implant kaybı olmadan ve tekrar cerrahi operasyona gerek kalmadan uygulanabilecek ve mükemmel biyoyumluluğa sahip implant malzemelerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bunun için bir yandan yeni malzeme arayışları devam ederken, bir yandan da mevcut malzemelerin yeni yaklaşımlarla modifiye edilmesine çalışılmaktadır. Sahip olduğu mükemmel korozyon direnci ve doku uyumu özellikleri nedeniyle titanyum ve titanyum alaşımları ön plana çıkmaktadır.

2.1.1. Titanyum İmplantlar

Metalik implant malzemeleri arasında özellikle ortopedik ve dental uygulamalarda kullanılan, 316 paslanmaz çelik ve Co-Cr alaşımları, Ni, Cr, Co iyonlarını içerir ve vücut içerisinde korozyona uğrayarak çevre dokulara toksik etki gösteren iyonlar salar. Ayrıca implant başarısında önemli bir özellik olan elastisite modülü değerleri kemiğe göre yüksektir ve gerilme kalkını (stress shielding) etkisine neden olarak protezde gevşemeye neden olmaktadır [15]. Titanyum (Ti) ve Ti alaşımları yüksek mukavemet, düşük yoğunluk, yüksek korozyon direnci, vücut dokusunda tam inertlik, kemik ve diğer dokulara entegre olabilme özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilen malzemelerdir. Ayrıca diğer metalik malzemelere göre kemiğe daha yakın modülüs değerlerine sahiptirler. Biyomedikal uygulamalar için hazırlanmış, alüminyum (Al), vanadyum (V), molibden (Mo), zirkonyum (Zr), niyobyum (Nb), paladyum (Pd) ve kalay (Sn) gibi elementler içeren pek çok Ti alaşımı bulunmaktadır. Özellikle ticari saf Ti ve Ti-6Al-4V alaşımları implant uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. Çeşitli Ti alaşımlarının kemikle karşılaştırılmalı elastisite modülleri (CP Ti: Saf Ti, CP Ta: Saf Tantalum, ST: Çözelti uygulanmış, solution treated, Aged: yaşlı).

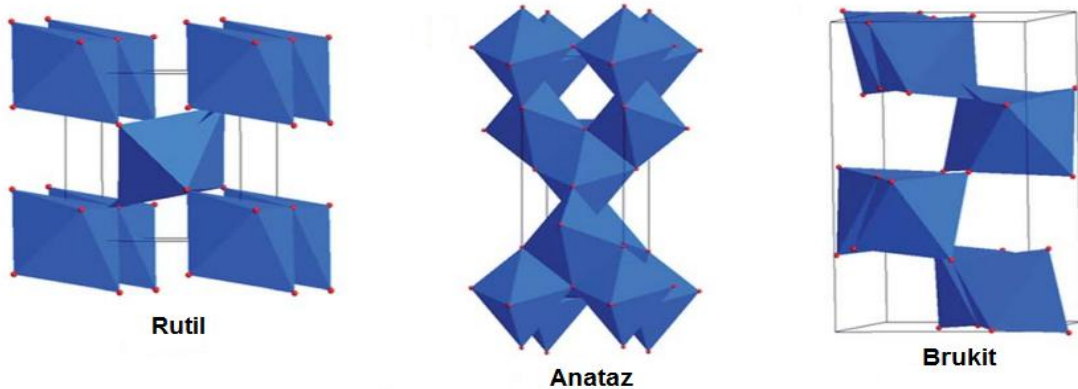
Klinik uygulamalarda kullanılan iki tip Ti implant malzemesi bulunmaktadır: ASTM (The American Society for Testing and Materials) standartlarına göre 1-4 CP saf ticari Ti (commercially pure, CP) ve 5-31 Ti alaşımları. Alaşım halde bulunmayan saf titanyum (CP Ti), oksijen ve demir içeriğine göre, Grade 1, Grade 2, Grade 3 ve Grade 4 olmak üzere 4 farklı şekilde bulunabilir [16]. Şekil 2.2'de çeşitli Ti alaşımlarının kemikle karşılaştırılmalı elastisite modülleri verilmiştir [2]. Çizelge 2.2'de ise saf ticari Ti'nin kimyasal bileşimi bulunmaktadır.

Çizelge 2.2. Saf Ti'nin kimyasal bileşimi (%ağırlık)

Element	Grade1	Grade2	Grade3	Grade4
Azot (Max.)	0.013	0.030	0.050	0.050
Karbon (Max.)	0.100	0.100	0.100	0.100
Hidrojen (Max.)	0.010	0.010	0.010	0.010
Demir (Max.)	0.200	0.300	0.300	0.500
Oksijen (Max.)	0.180	0.250	0.350	0.400
Titanyum(Max.)	99.480	99.310	99.190	98.940

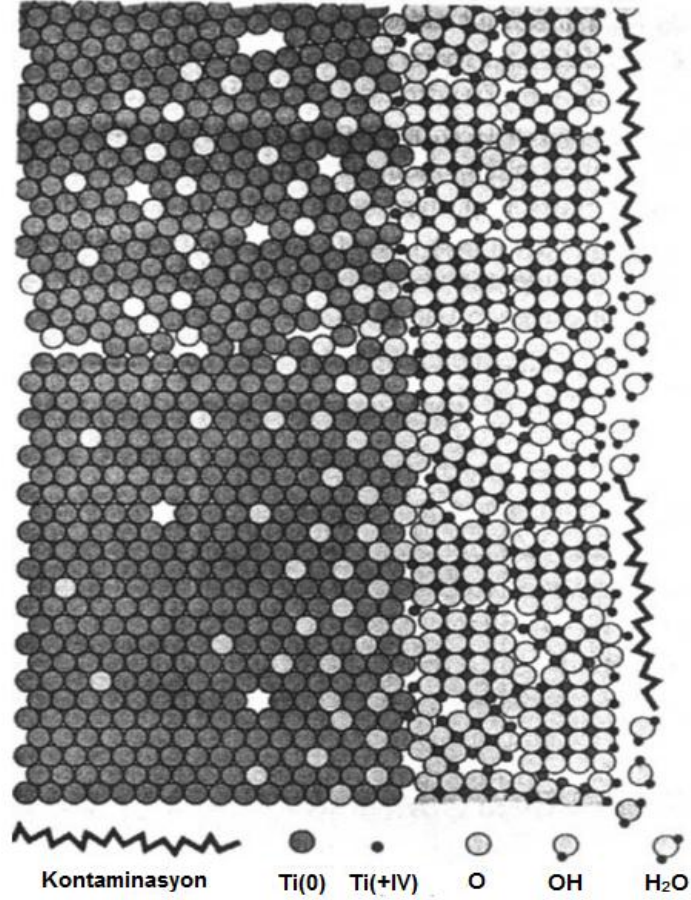
Titanyum implantlar ortopedik uygulamalarda kalça, diz omuz, omurga, ayak bileği gibi eklem protezi ve kemik yenileme malzemesi olarak veya çivi, vida, plaka gibi kemik sabitleme malzemeleri olarak kullanılır. Öte yandan çene cerrahisinde, diş implantlarında, kalp-damar cerrahisinde kalp pili ve yapay kalp kapakçıkları olarak da kullanım alanları bulunmaktadır [1].

Titanyum ve Ti alaşımları reaktif metallere ve oksijene maruz kaldıklarında yüzeyinde kendiliğinden 3-10 nm kalınlığında, kararlı oksit tabakası oluşur. Titanyum yüzeyinde farklı sitokiyometriye sahip birkaç çeşit oksit tabakası oluşmaktadır. Bunlar; TiO , Ti_2O_3 ve TiO_2 olup, en kararlı olanı TiO_2 'dir. TiO_2 , anataz, rutil ve brukit olmak üzere 3 farklı kristal yapıda ve amorf olarak bulunmaktadır (Şekil 2.3) [17]. TiO_2 'in kimyasal etkilere karşı oldukça kararlı olması, kendini anında yenileyebilmesi ve substrata oldukça güçlü yapışması onu korozyona en dayanıklı metallere biri yapmaktadır [18].



Şekil 2.3. Farklı sitokiyometrilere sahip titanyum oksit kristalin faz yapıları [17].

Titanyumun sahip olduğu mükemmel kimyasal inertlik, korozyon dayanımı ve biyouyumluluğu, oksit katmanın kimyasal kararlılığından ve yapısından kaynaklanmaktadır. Bu tabaka, malzemeyi vücut içerisinde karşılaşacağı oksidatif stres gibi kimyasal etkilere karşı dirençli kılar ve malzemeyi inert hale getirerek vücut içerisinde aşınmasını engeller. Mevcut oksit tabakası herhangi bir şekilde zarar görse bile hava ve su varlığında yeniden oluşabilmektedir. Oksit tabaka metalik iyonların difüzyonunu sınırlayarak, çevre dokularda zararlı iyon salımını engeller. Bu tabaka implant yüzeyinde kalsiyum ve fosfat birikimini destekleyerek kemik ve implant arasında biyouyumlu bir yüzey oluşturur, biyomoleküllerin ve hücrelerin malzeme yüzeyine yapışmasını destekler [19]. Titanyum yüzeyinde kendiliğinden oluşan bu oksit tabaka, malzemenin serbest yüzey enerjisini arttırmaktadır. Okside tabaka yapısal suyu bağlayarak en dış tabakada $-OH^-$ ve O^{2-} gurupları oluşturarak malzeme yüzeyine hidrofilik özellik kazandırır. Elektrolit çözelti ile temas ettiğinde apatitik kalsiyum fosfat oluşumunu sağlar. Titanyum oksit tabakası, malzemenin yüzey enerjisini artırarak protein yapışmasında, hücre yapışmasında ve implantın kemikle bütünleşmesinde önemli rol oynamaktadır [20, 21]. Şekil 2.4'de Ti yüzeyinde oluşan titanyum oksit tabakası bileşimi bulunmaktadır.



Şekil 2.4. Titanyum oksit tabakasının bileşimi [19].

Titanyum biyomalzemeler sahip oldukları üstün özelliklere rağmen, klinik uygulamalarda bazı sorunlarla karşılaşılmaktadır. Kullanılan Ti ve Ti alaşımlı implant malzemeleri uzun dönemli klinik uygulamalar için yetersiz kalırlar ve bu sorunları aşabilmek için malzemelere çeşitli yüzey uygulamaları ve modifikasyonları yapılmaktadır.

2.1.2. Titanyum İmplantların Yüzey Özellikleri ve Hücre Yapışmasına Etkisi

Dental ve ortopedik implant biyomalzemelerinin uzun süreli başarısı, implant ile doku arasında kuvvetli bir bağın oluşmasına bağlıdır. Kemik doku ve yük taşıyan implant yüzeyi arasındaki yapısal veya fonksiyonel bağlantı oluşumu, **osseointegrasyon veya osteointegrasyon** olarak adlandırılır. İyi bir osseointegrasyon sağlanamaması durumunda implantta gevşeme meydana gelir [13]. Bu nedenle implant ile kemiğin bütünleşebilmesi çok büyük bir önem arz etmektedir. Kullanılan implantın yüzey özelliklerine göre kemik dokusunun cevabı farklı olmaktadır. Osseointegrasyonun sağlanmasında cerrahi teknik ve implant

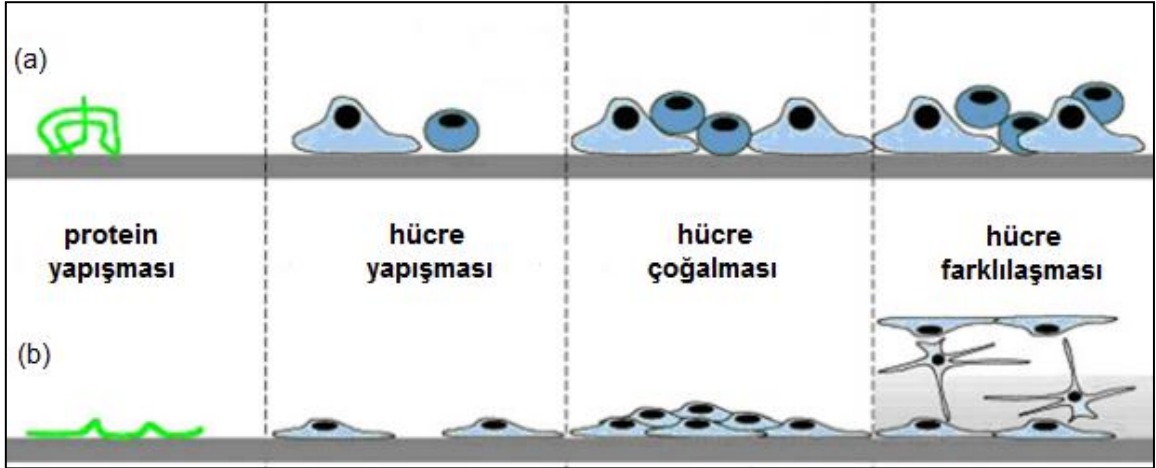
dizaynının yanı sıra, implant malzemelerinin yüzey kimyası, yüzey pürüzlülüğü, yüzey topografyası ve yüzey enerjisi gibi yüzey özellikleri de osseointegrasyonda önemli rol oynar. Ayrıca yüzey enerjisi gibi yüzey özelliklerinin de önemli olduğu bilinmektedir. İdeal implant malzemelerinin kemik iyileşme mekanizmasını engellemeyecek bir yüzeye sahip olması ve hatta bu yüzeyin iyileşmeyi artırıcı etkisinin bulunması gerekmektedir [2].

İmplant malzemelerinin yüzeylerine çeşitli uygulamalar yapılarak yüzey topografileri elde edilmekte ve hücre tiplerinin verdiği tepkiler değişiklik göstermektedir. Pürüzlü yüzey topografilerine sahip implant malzemeleri osteoblast hücre yapışmasını, farklılaşmasını, ekstraselüler matriks (ECM) üretimi ve mineralizasyonunu desteklemektedir. Mikron ve nano boyutta yüzey topografilerine sahip implant malzemeleri ile yapılan çalışmalarda, yüzey topografilerinin ECM üretimini etkili bir şekilde artırdığı, daha hızlı ve güvenilir bir osseointegrasyonun oluşumunu desteklediği gözlenmiştir [22].

In-vivo ve *in-vitro* pek çok çalışmada yüzey pürüzlülüklerinin hücreler üzerine etkileri incelenmiştir. İnsan primer osteoblastları ile yapılan bir çalışmada, yapışma, mineralizasyon, osteopontin, Runx2 gibi kemiğe özel proteinlerin üretimlerinin yüzey pürüzlülük oranına bağlı olarak arttığı gösterilmiştir [23]. Zinger ve arkadaşları, nano ve mikron boyutta pürüzlülüğe sahip Ti yüzeyler üzerinde, MG63 insan kemik kökenli hücrelerin yapışma, yayılma ve çoğalma davranışlarını incelemişlerdir. Çalışmada, nano boyutlu pürüzlülüğe sahip yüzeylerde kalın bir hücre tabakası oluştuğu ve düz yüzeydeki hücrelere göre daha fazla hücre uzantılarının bulunduğu gözlenmiştir. Otuz-yüz mikron boyutundaki pürüzlülüklerde ise hücrelerin büyük boyutta olan çukurların içlerine yerleşerek, 3 boyutlu halde çoğaldığı, mikro ve nano boyutta pürüzlülüklerin ise hücre çoğalmasına sinerjistik etki gösterdiği gözlenmiştir [24]. Guehenec ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, Ti yüzeylere farklı uygulamalarla yüzey pürüzlülükleri elde edilmiştir. Bu çalışmada pürüzlülük oranı arttıkça MC3T3 osteoblast öncülü hücrelerin yapışma, yayılma, çoğalma ve ECM üretiminin arttığı gözlenmiştir [25]. Gittens ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mikro ve nano kombine yapıların osteoblast benzeri hücrelerin olgunlaşmasını ve lokal faktör üretimini desteklediği, geç dönem farklılaşma belirteci olan osteokalsinin üretiminde etkili olduğu gösterilmiştir [26].

İmplant malzemelerinin yüzey pürüzlülüğü, hücre yapışma ve farklılaşmasını desteklemesinin yanı sıra kemik oluşumunu ve malzemenin osseointegrasyonunu da destekler. Elias ve arkadaşları farklı yüzey uygulamaları ile hazırlanmış, farklı büyüklükte pürüzlülük oranlarına sahip olan Ti diş implantlarının osseointegrasyona etkilerini, New Zeland tavşanlarında incelemiştir. Zımparalanmış yüzeyler, asit uygulanmış yüzeyler, TiO₂ (70µm) partiküllerle kumlanmış yüzeyler ve anodizasyon uygulanmış Ti yüzeylerin pürüzlülükleri karşılaştırılmıştır. Yüzey pürüzlülüğünün ve hidrofilitatesinin anodizasyon uygulanmış yüzeylerde en yüksek olduğu gözlenirken, en sıkı bağlanmanın yine anodizasyon uygulanmış yüzeylerde elde edildiği sonucuna ulaşılmıştır [27].

Malzeme yüzeyindeki nano yapıların hücre davranışları üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Nano boyutta yüzey pürüzlülükleri birincil protein yapışmasında görev almakta ve daha sonraki hücre yapışmasına etki etmektedir. Diğer yandan nanotopografiler yüzey ıslatılabilirliğini ve yüzey kimyasını da değiştirmektedir. Nano yapıların hücresel aktiviteleri düzenlediği yönünde pek çok çalışma yapılmıştır ancak tek başına osseointegrasyonu sağlamak için yeterli olmadıkları bilinmektedir. Malzeme yüzeyinde bulunan nanoboyuttaki pürüzlerin hücre davranışlarına etkisi Şekil 2.5'te gösterilmiştir [28].



Şekli 2.5. Nano boyutta pürüzlülüğün protein yapışması, hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşmasına etkisi. a) nanoboyutta yapılar içermeyen yüzey, b) nanoboyutta yapılar içeren yüzeyler [29].

Yüzey pürüzlülüğünün yanı sıra yüzey enerjisi, hücre cevabını etkileyen önemli bir diğer faktördür. Yüzey enerjisi, malzeme yüzeyinin polarite ve ıslatılabilirliğini

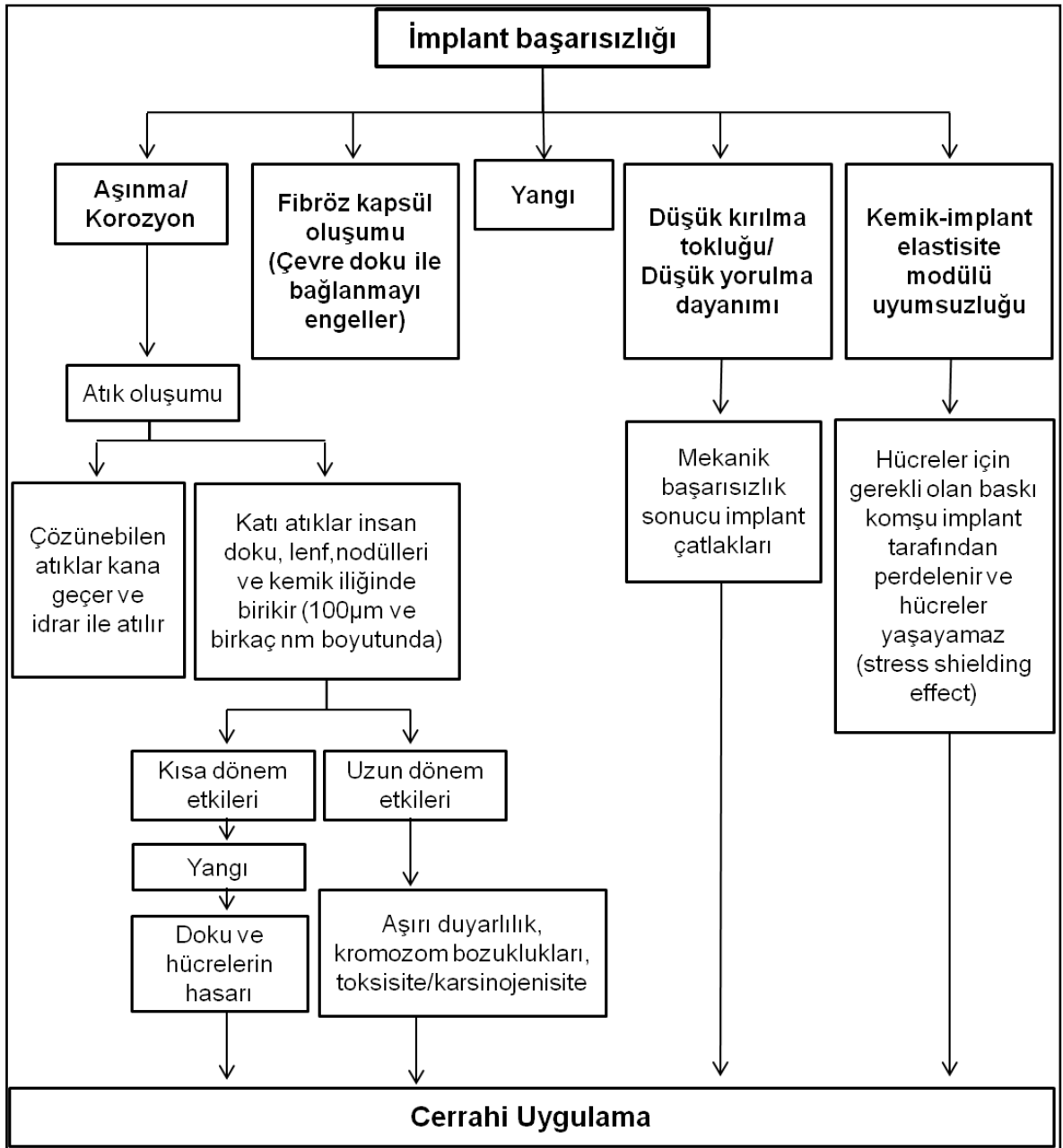
etkilemektedir. Yüksek yüzey enerjisi, artan ıslatılabilirlik nedeniyle implant yüzeyi ile biyolojik çevre arasındaki etkileşimleri arttırmaktadır. Yüzey hidrofilitesi, biyomalzemelerin biyouyumluluğunu belirlemektedir ve yüzey enerjisine bağlıdır. Yüzey enerjisi daha yüksek olan, hidrofilik yüzey özelliğine sahip implantların başarı oranı daha yüksektir. Bu implantlar hücre ve protein yapışmasını destekler, hücre yayılması ve çoğalmasını uyararak osseointegrasyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynar [16]. Ericsson ve arkadaşlarının yaptığı *in-vivo* çalışmada, sıçan tibiasına implante edilmiş, hidrofilik yüzeye sahip Ti diskler kullanılmıştır. 8 günlük çalışmada malzeme yüzeyinde canlı ve apoptotik hücrelerin bulunduğu, BMP-2 pozitif hücre sayısının belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir [30]. İkinci defa yaptıkları 3 haftalık *in-vivo* çalışmada ise BMP-2, ALP, VEGF pozitif hücrelerin varlıkları incelenmiştir. Yüksek yüzey enerjisinin, düşük yüzey enerjisine sahip malzemelere göre hücre aktivasyonu ve farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir [31]. Kennedy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada cam lamel yüzeyler SAM (self assembled monolayer) ile kaplanmış ve UV ışın uygulaması yapılmıştır. En son basamakta fibronektin ile kaplanan yüzeylerle MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı kullanılarak yüzey enerjisinin hücre davranışlarına etkisi incelenmiştir. Yapılan kültür çalışmasında, yüzey enerjisinin ve hidrofilitesinin artmasıyla doğru orantılı olarak hücre çoğalmasının arttığı gösterilmiştir [32]. Zaho ve arkadaşları; Ti yüzeylerde mikron boyutta pürüzlülük ve yüzey enerjisinin MG63 hücreleri üzerindeki sinerjik etkisini incelemiştir. Farklı yöntemlerle pürüzlülük oluşturulan Ti implant malzemeleri üzerine gama ışını uygulanarak yüzey enerjilerinin daha yüksek olduğu malzemeler hazırlanmıştır. Yüksek yüzey enerjisinin tek başına hücre cevabı üzerinde etkili olmadığı, ancak yüksek pürüzlülüğe sahip malzemelerde sinerjik etki göstererek osteoblast hücrelerinin yapışmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve matris üretimini arttırdığı gözlenmiştir [33].

2.1.3. Titanyum İmplant Kaynaklı Sorunlar

Biyomalzemelerin vücutta istenen işlevleri yerine getirebilmesi için mekanik güç, yapısal bütünlük ve biyouyumluluk özelliklerini sağlaması gerekmektedir. Ancak doku ve vücut sıvılarıyla temas halinde olan biyomalzemeler, oluşan akut ya da kronik yangısal reaksiyonlar, korozyon ve çözülme gibi kimyasal değişimlerle bütünlüklerini ve işlevlerini yitirebilir, zamanla deformasyona uğrayabilirler. İmplant malzemelerinde oluşan deformasyonlar, implantın görevini yerine getirememesine

neden olurken, malzemenin bozulması, bulunduğu dokuda yıkıma neden olarak ciddi sorunlar yaratabilir. Bir implantın vücut içerisindeki başarısı, malzeme özellikleri, dizaynı ve biyouyumluluğu başta olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Biyomedikal uygulamalar için kullanılan biyomalzemeler konusunda büyük gelişmelere rağmen halen pek çok sorunla karşılaşmaktadır. İmplant malzemelerinin başarısız olmalarına neden olan durumlar Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. İmplant başarısızlıklarına neden olan durumlar [2].



Ti ve Ti alaşımı biyomalzemelerin, mükemmel korozyon dirençlerine ve yüksek biyoyumluluğa sahip olmalarına rağmen, uzun dönem kullanımlarında özellikle Ti alaşımlarında, alüminyum ve vanadyum salımı gözlenmekte, Ti malzemeler kayma dayanımlarının düşük olması nedeniyle sürtünme ile aşınmaya uğramaktadırlar. Bu nedenle Ti implant malzemelerinin korozyon direnci, aşınma direnci, yüzey özellikleri ve biyoyumluluklarını arttırmak için çeşitli yüzey modifikasyonları uygulanmaktadır [34].

İmplant malzemelerinde karşılaşılan önemli bir problem ise **stres kalkanı (stres shielding)** etkisidir. Bu sorun kemik oluşumu ve şekillenmesi sırasında kemiğe uygulanan mekanik yüklerin implant malzemesi nedeniyle değişmesi sonucu oluşur. Kemiğe implant uygulamasından sonra, kemiğe gelen yüklemelerin azalması, kemik kitlesinin ve geometrisinin değişmesine neden olarak implant çevresindeki kemik dokunun kaybına neden olur. Bu etki özellikle uygulanan implant ile kemik arasındaki sertlik farkı arttıkça daha fazla görölmektedir. Ti ve Ti alaşımlarının; elastik modöls değerlerinin kemiğe, diğer metalik malzemelerden daha yakın olması nedeniyle daha az stres kalkanı etkisi gözlenir [15]. Ancak tüm bu avantajlarının yanı sıra, Ti ve Ti alaşımlarının mekanik özellikleri tam anlamıyla biyomedikal uygulamalar için yeterli değildir ve bu nedenle Young modöls değerleri kemiğe daha yakın olan farklı malzemelerin kullanımı gündeme gelmiştir [35].

Titanyum implant malzemelerinde karşılaşılan en büyük sorunlar ise; implant kaynaklı enfeksiyon oluşumu ve osseointegrasyonun sağlanamamasıdır. Bu iki problemi çözebilmek için çeşitli yüzey modifikasyonları uygulanmaktadır. Tez çalışması dahilinde implantların başarısını engelleyen bu iki sorunu aynı anda çözmeyi hedefleyen yüzey kaplamasının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2.1.3.1. Kemik oluşumu ve osseointegrasyonun sağlanamaması

Ortopedik biyomalzemelerin uzun süreli başarısı genel olarak implant ile doku arasındaki osseointegrasyon sürecine bağlıdır. Kemik implant arasındaki sıkı bağın oluşumu implantın yerleştirilmesinden birkaç ay sonra gerçekteşir. Yerleştirilecek kemiğin niteliği, implant materyalinin doku uyum ve tasarımıının yanı sıra kullanılan implantın yüzey özellikleri osseointegrasyonun sağlanmasında büyük öneme sahiptir. Ayrıca kemik oluşumunun yeterli olmaması sonucu implant

çevresinde fibröz doku oluşumu gerçekleşerek osseointegrasyonun sağlanmasını engeller. Ti implant malzemeleri sahip oldukları yüzey özellikleri sayesinde tek başlarına, kemik hücrelerini yapışmasını ve implant çevresinde kemik oluşumunu destekler ancak sıkı bir osseointegrasyonun oluşması için yeterli olmaz [36]. Tüm kalça değişimi gibi ortopedik uygulamalarda kullanılan çimentosuz metalik malzemeler başarılı sonuçlar göstermesine rağmen, kemik doku-metal arasında kemik oluşumunu arttırmak, küçük hareketleri engellemek için ameliyat sonrası erken dönemde birkaç hafta sınırlı yük uygulanması önerilmektedir. Ayrıca düşük kemik kalitesi, osteoporoz, renal osteodistrofi, romatolojik hastalıklar ve yeniden yapılan ameliyatlara (revizyon ameliyatlara), osseointegrasyonu geciktirir ya da engeller. Biyomedikal uygulamalarda karşılaşılan bu sorunlar implant kayıplarına sebep olur. Geliştirilen biyolojik tedavilerle implant yüzeyinde kemik gelişiminin desteklenmesi hedeflenmektedir [37]. Bu nedenle ameliyat sonrası iyileşme sürecindeki riskleri en aza indirmek, implantın başarılı bir şekilde kemiğe sabitlenmesini sağlamak ve daha hızlı kemik oluşumu gerçekleştirmek için Ti malzemelerin yüzeylerine çeşitli uygulamalar yapılmaktadır [38]. Yüzeyleri biyolojik olarak aktif tasarlanan implantlar kemik oluşumunu arttırmakta ve doğru orantılı olarak iyileşme zamanını kısaltarak implant başarısızlıklarını engellemektedir. Yüzey kaplamalarında ve modifikasyonlarında hormonların kullanılması ya da implant yüzeylerinin ECM motifleri ile modifiye edilmesi, osteoblast hücrelerinin uyarılmasında ve biyomineralizasyonun oluşumunda önemli rol oynamaktadır [37].

2.1.3.2. İmplant kaynaklı enfeksiyon oluşumu

Ortopedik ve dental implantlarda sıklıkla kullanılan Ti ve Ti alaşımlarında gözlenen enfeksiyon oluşumu; implant kaybı, hasta şikayetleri, finansal kayıplar ve ölüm gibi pek çok yaygın ve önemli sorunu beraberinde getirmektedir [39]. İmplantasyonun gerçekleştiği erken fazlarda cerrahi uygulamanın yapıldığı bölgede savunma sistemi bozulmuş olur ve bu dönem enfeksiyon oluşumu için en tehlikeli dönemi oluşturur. İmplant malzemelerinin aseptik koşullarda implantasyonu veya kullanılan malzemelerin kontamine olması enfeksiyon oluşumuna neden olabileceği gibi, özellikle eksternal fiksasyon çivileri ve dental implantlarda gözlenen hasta vücut florası bakterileri de enfeksiyonlara neden olabilir [40]. Çeşitli sterilizasyon uygulamaları ve operasyon sonrası antibiyotik uygulamaları ile implant kaynaklı

enfeksiyon oluşumları azaltılmasına rağmen, bu durum hala implant malzemelerindeki en büyük sorunlardan birini oluşturmaktadır [41].

İmplant kaynaklı enfeksiyon oluşumuna en çok Stafilokok cinsi bakteriler, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* neden olmaktadır. *Staphylococcus epidermidis* normal deri florasının bir parçası olmasına rağmen implantasyon sırasında vücut içerisine girmesiyle enfeksiyon oluşumuna neden olmaktadır. *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis* implant kaynaklı enfeksiyon oluşumuna neden olan diğer bakteri türleri arasındadır [41]. Enfeksiyon oluşumunun en önemli aşaması, bakterinin biyomalzeme yüzeyine tutunmasıdır. Hücre tutunmasıyla birlikte yüzeyde çoğalmaya ve biyofilm oluşumuna neden olurlar. **Biyofilm tabakası**, mikroorganizmaların kendilerini antibiyotik, antikor ve bakteri öldürücü ajanlardan (oksidan) çeşitli mekanizmalar ile korumak için ürettikleri ekzopolisakkarit yapıda bir matrikstir [42].

Bakterilerin yüzeye yapışma mekanizmaları;

Bakterilerin malzeme yüzeyine yapışması şartlanma evresini takiben aşağıda açıklanan 2 basamakta gerçekleşmektedir. Bu basamakları takiben de biyofilm oluşumu görülebilmektedir.

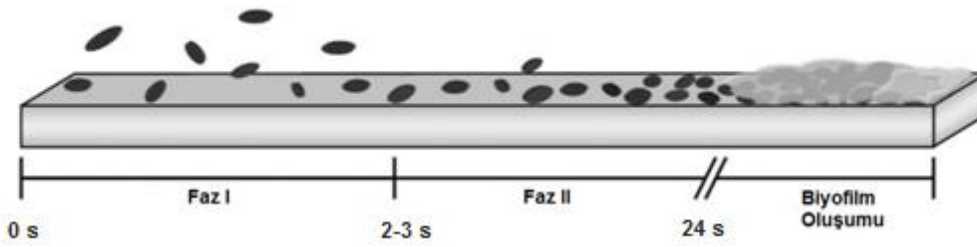
Şartlanma evresi; malzemelerin vücuda implantasyonundan sonra fizyolojik koşullarda malzeme yüzeyi, su, albumin, yağ, ECM, fibronektin ve inorganik tuzlar gibi moleküller ile modifiye olmaktadır [43]. Oluşan tabaka malzemenin yüzey hidrofobitesini değiştirerek bakteriyel yapışma, koloni oluşumu ve sonrasında biyofilm oluşumuna karşı yüzeyi duyarlı hale getirir [44].

Bakteriyel yapışma 2 basamakta gerçekleşir;

Birincil yapışma (docking stage): Bakteriler kuvvetli olmayan fiziksel (hidrofobik, elektrostatik) etkileşimlerle geri dönüşümlü olarak yüzeye tutunur [45].

İkincil yapışma (locking stage): Bakterilerin geri dönüşümsüz olarak spesifik yapışma molekülleri ve malzeme yüzeyi arasında moleküler yapıda bağlanmanın gerçekleştiği fazdır. Birincil yapışma ile gevşek yapıda yüzeye bağlanmış olan mikroorganizmalar, bu fazda ekzopolisakkarit üreterek ya da pili ve fibriyaları aracılığıyla yüzeye tutunur [45].

Biyofilm oluşumu: Bakterilerin implant malzeme yüzeyine geri dönüşümsüz olarak bağlanmasıyla biyofilm oluşumu başlar. Çevresel hidrodinamik akış, içsel pH, oksijen perfüzyonu, karbon kaynakları, ve ozmolaritenin optimum koşullarda sağlanabilmesi biyofilmin olgunlaşmasını destekler. Biyofilm tabakasının kritik hacme ulaşması ile bakteriler biyofilmden ayrılarak başka yüzeylere kolonize olur ve yeni biyofilm oluşumlarına neden olurlar [42]. Şekil 2.6'te bakterilerin malzeme yüzeyine yapışması ve biyofilm oluşumu gösterilmiştir [44].



Şekil 2.6. Biyofilm oluşumu. Faz I. Bakterilerin malzeme yüzeyine geri dönüşümlü olarak yapışması (docking stage), Faz II. Bakterilerin malzeme yüzeyine geri dönüşümsüz olarak yapışması (locking stage), Ekzopolisakkarit üretimi (Biyofilm oluşumu) (s:saat).

Biyofilm oluşumu gerçekleştikten sonra uygulanan rutin antibiyotik tedavileri implant kaynaklı enfeksiyonu azaltmak için yeterli olmaz. Hala implant kaynaklı enfeksiyonu engellemek için etkin bir tedavi bulunamadığı için problemi yok etmede en etkili çözüm implantın yenisiyle değiştirilmesidir. Bu durum ise hastayı hem maddi hem de tıbbi açıdan olumsuz etkilemektedir [41, 46, 47]. Bu nedenle enfeksiyonların engellenmesi için yeni stratejilerin geliştirilmesine devam edilmektedir. Kullanılacak malzeme yüzeylerine bakteri yapışmasını engelleyecek modifikasyonlar uygulanmakta, bakteri tutunması ve biyofilm oluşumları engellenmeye çalışılmaktadır. İmplant malzeme yüzeylerine antibiyotik, antibakteriyel veya antimikrobiyal ajan hapsedilmiş kaplamalar, antibakteriyel biyoaktif polimerler veya yapışma dirençli polimerlerle yüzey modifikasyonları uygulanmakta ve implant kaynaklı enfeksiyon oluşumunu engelleyecek implant malzemeleri üretilmeye çalışılmaktadır [41, 48]. Yapılan tüm bu işlemler, i.yüzey modifikasyonları ve ii.yüzey kaplamaları olarak iki ana başlık altında devam eden bölümlerde açıklanmıştır.

2.1.4. Titanyum İmplantların Yüzey Modifikasyonu

Titanyum biyouyumlu özellik göstermesine rağmen kemik oluşumundaki biyolojik süreçleri pozitif yönde etki etmesi kısıtlıdır. Çünkü Ti kendi başına kemik apozisyonunu uyaramaz. Bu nedenle son zamanlardaki araştırmalar erken entegrasyonu hızlandıracak ve ihtiyaç duyulan tedavi zamanını kısaltacak olan yüzey kaplamalarının ve yüzey işlemlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Bu amaçla farklı yüzey işleme yöntemleri uygulanarak biyomalzeme yüzeyine farklı özellikler kazandırılmaktadır [33]. Çizelge 2.4'de Ti implant malzemelerine uygulanan yüzey modifikasyon yöntemleri listelenmiştir.

Çizelge 2.4. Titanyum implant malzemelerine uygulanan yüzey modifikasyonları

Fiziksel Yöntemler	Kimyasal Yöntemler	Mekanik Yöntemler	Biyokimyasal Yöntemler
Termal Püskürtme	Asit Muamelesi	İşleme	Protein Adsorpsiyonu
Plazma Püskürtme	Alkalin Muamelesi	Tornalama	Biyomoleküllerin İmmobilizasyonu (enzimler, ilaçlar)
Fiziksel Buhar Biriktirme	Sol-Jel Muamelesi	Kesme	Flor ve Hidroksiapatit ile Modifikasyon
İyon İmplantasyonu	Anodik Oksidasyon	Kumlama	
Akkor Boşalma Plazma Muamelesi	Kimyasal Buhar Biriktirme	Parlatma	
	Yüzey Aktif Maddeleriyle Kaplama		
	Polimerlerle Kaplama		
	Antibakteriyel Ajanlar ile Kaplama		

Yüzey uygulamaları malzeme yüzeylerinde mikron ve nano boyutta yüzey topografileri oluşturmanın yanı sıra kimyasal özellikleri değiştirmek amacıyla da uygulanmaktadır. Bu uygulamalar, mekanik, fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal yöntemler olmak üzere 4 grupta incelenebilir.

Mekanik yöntemler: İmplant malzemelerinin yüzeylerine çeşitli mekanik uygulamalar yapılmakta ve farklı yüzey pürüzlülüğü oranlarına sahip malzemeler hazırlanmaktadır. Farklı boyutlardaki partiküller ile yapılan kumlama işlemi yaygın olarak uygulanan etkin bir mekanik yüzey pürüzlendirme işlemidir. Kum püskürtme işlemlerinde sıklıkla silika (kum), rezorbe olabilen seramik, alumina ve titanyum dioksit kullanılmakta ve oluşan pürüzlülük boyutları kullanılan partikül boyutlarına

göre değişmektedir [49-51]. Kum püskürtme yöntemiyle hazırlanmış Ti implant malzeme yüzeylerinde partikül olarak bozunabilen HA partiküller kullanılmış ve tavşanlarda malzeme yüzeyinin kemik oluşumuna etkisi incelenmiştir. HA ile kumlanan yüzeylerin pürüzlülüğünün arttığı ve düz yüzeylere göre kemik oluşumunu daha iyi desteklediği gözlenmiştir. Pürüzlü Ti malzeme yüzeylerinin pürüzsüz yüzeylere göre daha fazla alkalen fosfataz (ALP) pozitif hücrelerle kaplandığı ve daha yüksek kemik-implant temas değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir [51].

Fiziksel yöntemler: Titanyum Plazma Sprey (TPS), implant yüzeyine yüksek derecede Ti tozları püskürtülerek, yüzeyde yaklaşık 30 µm kalınlığında bir film tabakası oluşturan bir yöntemdir. TPS kaplama ortalama 7 µm'lik bir pürüzlülük sağlar ve implantın yüzey alanını genişletir. Ancak çevre dokulara metal partikül salımına neden olabileceği için klinik uygulamalar için uygun bir metot değildir [52]. Plazma sprej yöntemiyle implant çevresinde kemik oluşumunu destekleyen ve %60-70 oranında HA içeren kaplamalar yapılmaktadır [16].

Kimyasal yöntemler: Yüzey pürüzlendirmek amacı ile kullanılan diğer bir yöntem ise kimyasal pürüzlendirme işlemidir. Kimyasal yöntemlerde, asit muameleleriyle yüzeyde farklı topografiler oluşturulurken, alkali uygulamalarda Ti malzeme yüzeyindeki titanyum oksit tabakasının kalınlığı arttırılmaktadır [49]. Asit ile yüzey pürüzlendirme işlemlerinde hidroklorik asit (HCl), sülfürik asit (H₂SO₄), nitrik asit (HNO₃) ve hidroflorik asit (HF) gibi güçlü asitler kullanılmaktadır [53]. Yüzeye uygulanan asit ve alkalilerin malzeme yüzeyinde CaP apatit oluşumunu desteklediği pek çok çalışma ile gösterilmiştir [54-56].

Yüzeylerde daha düzensiz ve pürüzlü bir görünüm elde edilmesi için kumlama ve asitle dağlama yöntemleri birleştirilerek uygulanmaktadır. Asitle dağlama işlemi yüzeyin topografik profilini arttırmayı ve işlemler sırasında oluşan artık ürünleri yüzeyden uzaklaştırmayı amaçlamaktadır. Kum püskürtme sonrasında uygulanan asitle dağlama işlemlerinde hidroflorik asit, nitrik asit, sülfürik asit ya da farklı asit çözelti kombinasyonları kullanılmaktadır. Ayrıca asitleme-kumlama uygulanan yüzeylere hidrofilik özellik kazandırılarak iyileşme sürecinin hızlandırıldığı gösterilmiştir [25]. Titanyumun H₂SO₄, H₃PO₄, HNO₃ ve HF gibi güçlü asitler içerisinde yüksek yoğunlukta (200 A/m²) veya potansiyelde (100 V) **potansiyostatik veya galvanostatik anodizasyonu** sonucu oksit tabakada mikro

veya nano gözenekli yapılar oluşur. Anodizasyon sonucunda Ti yüzeyindeki oksit tabaka 600-1000 nm veya daha kalın olmaktadır. Titanyum oksit tabakası implant yüzey enerjisini artırarak, hücre yapışmasını ve osseointegrasyonu desteklemektedir [57].

Biyokimyasal yöntemler: İmplantlar üzerine yapılan araştırmalar nanoyapılı çevreyi taklit ederek (ECM gibi) hücre ve doku büyümesini destekleyen biyomalzemelerin tasarımına odaklanmıştır. Gerçek dokularda nanoboyutta protein etkileşimleri; hücre çoğalması, hücre göçü, ECM matriks üretimi gibi hücre fonksiyonlarını kontrol etmekte önemli rol oynarlar [16]. Ti implant malzemelerinin nanoboyutta yüzey modifikasyonları için çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Kendiliğinden düzenlenen tek katmanlar (SAM), nanopartikül depozisyonu, litografi ve çeşitli fiziksel, kimyasal uygulamalarla yüzey modifikasyonları yapılmaktadır [29]. Ayrıca osseointegrasyonu arttırmayı veya enfeksiyon oluşumunu engellemeyi hedefleyen, çeşitli biyoaktif seramikler, biyosinyal moleküller ve polimerlerle yüzey kaplamaları yapılarak biyoişlevselliği yüksek biyouyumlu biyomalzemeler elde edilmektedir.

2.1.5. Titanyum İmplant Yüzey Kaplamaları

Titanyum implant malzemelerinin yüzey modifikasyonları arasında yer alan kaplamalar enfeksiyon oluşumunu engellemek amacıyla yapılan antibakteriyel yüzey kaplamaları ve osseointegrasyonu arttırmak amacıyla yapılan kaplamalar olmak üzere iki başlık altında toplanabilir.

2.1.5.1. Antibakteriyel yüzey kaplamaları

İmplant kaynaklı enfeksiyon oluşumu; ortopedik ve dental uygulamalarda en önemli sorunlardan birini oluşturmaktadır. İmplantasyon sırasında kullanılan steril operasyon teknikleri, ameliyat bölgesinin yıkanması, ameliyat sonrası sistemik dolaşıma antibiyotik verilmesi gibi uygulamalar implantlarda karşılaşılan enfeksiyon oluşumunu engellemek için yeterli olmamaktadır ve hastada ağrı ve acı gibi sorunlara neden olduğu gibi aynı zamanda maddi kayıplara da yol açmaktadır [58].

İmplant edilen malzemelerin yüzeylerinde gerçekleşen, bakteri kolonizasyonu ve biyofilm oluşumu; kemik ve çevre dokularda enfeksiyona neden olmaktadır. Biyofilm oluşumundan sonra polisakkarit yapıdaki tabakanın altında antibiyotik ve

konak immün sistemine karşı dirençli hale bakteriler, malzeme yüzeyinde kemik iyileşmesini veya büyümesini engellemekte, kırıkların kaynamaması ve implant kayıpları gibi sorunlara neden olmaktadır [36].

İmplant kaynaklı sorunları çözmek için en etkili yöntem implant yüzeyinde bakteri kontaminasyonunu tamamen engellemektir. İmplant yüzeyine bakterilerin birincil yapışmasını engellemek amacıyla antibakteriyel yüzey kaplamaları geliştirilmiştir. Kaplamalar antibakteriyel ajan salımına bağlı olarak aktif ve pasif kaplamalar olarak ikiye ayrılır. Çizelge 2.5'de enfeksiyon önleyici yüzey kaplamaları sınıflandırılmıştır.

Çizelge 2.5. İmplant malzemelerine uygulanan enfeksiyon önleyici yüzey kaplamaları

Aktif kaplamalar	Kullanılan malzemeler
Antibiyotik içeren kaplamalar	Gentamicin, Cephalothin, Carbenicilin, Amoxicillin, Cefamandol, Tobramycin, Vancomycin
Antibiyotik olmayan organik antimikrobiyal ajan içeren kaplamalar	Kloroheksidin, Kloroksilenol, Poli(hekzametilenbiguanid)
İnorganik antimikrobiyal ajan içeren kaplamalar	Gümüş (Ag), Novaron
Pasif kaplamalar	Kullanılan malzemeler
Yapışma dirençli kaplamalar	-Fiziksel ve kimyasal yüzey özelliklerinin değiştirilmesi -Yapışma engelleyen polimer kaplamalar
Antibakteriyel biyoaktif polimerlerle işlevselleştirilmiş kaplamalar	Kitosan, Hyaluronik asit

Pasif kaplamalar, çevre dokulara bakterisit ajan salmadan, bakteriyel yapışmayı engelleyerek veya temas ile bakterileri öldürerek biyofilm oluşumunu ve enfeksiyon oluşumunu engelleyen kaplamalar olup implant malzemelerinin yüzey hidrofilitatesini ve kristal yapısı gibi yüzey özelliklerini değiştirerek etki ederler. Pasif kaplamalar, vücut içerisinde uzun süre bölgesel veya genel yan etkileri olmadan antibakteriyel özelliklerini korurlar [40].

Aktif kaplamalar; antibiyotik, antiseptik ajan, gümüş (Ag), azot oksit (NO) gibi bakterisit ajan salımı yaparak implant kaynaklı enfeksiyon oluşumunu engelleyen kaplamalardır. Bu kaplamalar ancak ameliyat sonrası erken dönemdeki cerrahi

kontaminasyonlardan kaynaklanan enfeksiyonları önleyebilir ve implantasyondan sonra sınırlı bir süre ajan salımı sağlayabilirler. Ayrıca yeterince bakterisit içeren kaplamalar üretmek ve ilaç salım miktarlarının kontrolü en büyük sorunlarından biridir [40].

Antibiyotik içeren kaplamalar - Ameliyat sonrası korunma amaçlı sistemik dolaşımla antibiyotik tedavisi gerçekleştirilmesine rağmen bu tedavinin pek çok dezavantajı bulunmaktadır. Sistemik dolaşıma verilen antibiyotik dozları, hedeflenen bölgelerdeki enfeksiyonlara etkili olmakta yetersiz kalır ve verilen daha yüksek dozlar toksisiteye neden olabilir [40]. Bu nedenle implant malzemelerinde antibiyotiklerin lokal olarak kullanımı gündeme gelmiştir. Yapılan pek çok çalışmada Ti malzemelerin yüzeyleri, antibiyotik içeren kaplamalarla modifiye edilmiştir. Antibiyotikler, Ti yüzeylere kovalent olarak bağlanabileceği [59, 60] gibi çeşitli polimer, nanotüp ve HA gibi kaplama malzemeleriyle birleştirilerek yüzey uygulamalarında kullanılmaktadır [61-63].

Antibiyotik olmayan organik antimikrobiyal ajan içeren kaplamalar - Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç oluşturması sorununa karşı antibiyotik olmayan klorheksidin, kloroksilenol gibi antimikrobiyal ajanlar kaplama malzemesi olarak kullanılabilir [40].

İnorganik antimikrobiyal ajan içeren kaplamalar - Çeşitli inorganik antimikrobiyal ajanlar, iyi antibakteriyel yetenekleri, mükemmel biyouyumlulukları ve yeterli kararlılıkları sebebiyle tercih edilirler. Katkı maddelerinin arasında gümüş (Ag) en çok bilinenidir. Gümüş, gram pozitif, gram negatif ve bazı dirençli bakteriler üzerine etkilidir. Bakterilerin biyomalzeme üzerine yapışmasını engellediği gibi yan etki göstermeden uzun süreli antibakteriyel etkinlik göstermektedir [64]. Titanyum malzemelerin yüzeylerine gümüş, galvanizleme, plazma immersiyon iyon implantasyonu (PIII) ve fiziksel buhar biriktirme (PVD) yöntemleriyle kaplanmakta veya HA kaplama malzemesi içerisine katılarak antibakteriyel kaplamalarda kullanılmaktadır [36, 64, 65].

Yapışma dirençli kaplamalar - Yüzey pürüzlülüğü, yüzey kimyası, hidrofilitesi, yüzey enerjisi ve yüzey potansiyeli gibi implant yüzey özellikleri hayvan hücrelerinin yapışmasını etkilediği gibi bakteriyel yapışma ve koloni oluşumunda da önemli rol oynamaktadır. Bu yüzey özellikleri, protein yapışma miktarı ve

konformasyonlarını etkileyerek, bakteri yapışma ve biyofilm oluşumunu etkilemektedir [36]. Titanyum malzemelerinin yüzeyine UV ışık uyarımı ile anataz tip okside tabaka oluşturulur. Bu tabaka bakterilerin yapışmasını engellerken, malzeme yüzeyinde oluşan titanyum oksit tabaka hücre aktivitesini arttırarak, hem antibakteriyel özelliğe sahip, hem de osseointegrasyonu destekleyen yüzeyler oluşturulmaktadır [66]. Bu uygulamaların yanı sıra, malzemelerin yüzeylerine hidrofilik özellikte olan poli(metakrilik asit), poli(etilen glikol), poli(etilen oksit) ve poliüretan gibi protein ve bakteri yapışmasına dirençli olan polimer kaplamaları da uygulanmaktadır [44, 67, 68]. Ancak bu malzemeler ile kaplanmış olan yüzeyler osteoblast fonksiyonlarını da azaltmaktadır. Bu sorunu çözmek için yüzey kaplamaları çeşitli biyoaktif moleküllerle (RGD, serisin) işlevselleştirilmektedir [40]. Yapılan tez çalışmasında da yapışma engelleyen polimerler ile titanyum yüzeylere antibakteriyel özellik kazandırılması amaçlanmıştır.

Antibakteriyel biyoaktif polimerlerle işlevselleştirilmiş kaplamalar- Kitosan, hyalüronik asit gibi biyoaktif özellikte olan polimerler, bakteri yapışmasını, çoğalmasını ve aktivitesini engellemektedir. Bu polimerler hem osseointegrasyonu destekledikleri, hem de implant yüzeyine antibakteriyel özellik kazandırdığı için kaplama malzemesi olarak tercih edilmektedir [69].

2.1.5.2. Osseointegrasyonu arttıran yüzey kaplamaları

Malzemelerin mekanik özellikleri (Young's modülüs değerleri, yorulma direnci), malzeme cinsine bağlı iken, biyolojik etkileri implant yüzeyi ve özellikleri ile alakalıdır. Saf titanyum hücre yapışmasını ve kemik ile bütünleşmeyi destekler ancak tam bir osseointegrasyonun sağlanması için yeterli olmaz. İmplant malzemelerine yapılan tüm yüzey modifikasyonlarına ilave olarak osteoblastik aktiviteyi arttırabilmek ve kemik apozisyonunu sağlamak için çeşitli yüzey kaplamaları uygulanmaktadır. Metalik implantların kaplanmasıdaki temel amaç, yük taşıyıcı özelliği gibi mekanik özelliklerini devam ettirerek, osseointegrasyonu arttırmaktır. Kemik ile bağlanma özelliği olan biyoaktif seramikler, apatitler, kalsiyum fosfatlar ve kemik morfojenik proteinleri (BMP) ile muamele edilmiş osteokondüktif ve osteoindüktif malzemeler implant yüzeylerinin kaplanmasında kullanılarak pek çok çalışma yapılmıştır [70]. Osseointegrasyonu arttıran yüzey kaplamaları Çizelge 2.6'da sınıflandırılmıştır.

Çizelge 2.6. Osseointegrasyonu arttıran yüzey kaplamalarının sınıflandırılması [71].

	<u>Yüzey modifikasyonu</u>	<u>Etkileşim</u>
İnorganik kaplamalar	CaP seramikleri	Çözünme ve doğrudan tutunma yoluyla kemik ile kimyasal bağlanma
	İyon katkısı	CaP kimyasal yapısına iyon katkısı ve salım
	Biyomolekül katkısı	CaP kaplı yüzeye doğrudan tutunma ve salım
Organik kaplamalar	ECM proteinleri	Malzemeye kimyasal olarak bağlanma ve dokuya özgü hücrelerle etkileşimler
	BMPs ve büyüme faktörleri	İmplant yüzeylerine doğrudan tutunma ya da kaplama içine katkı yoluyla etkileşim ya da salım
	Peptidler	Malzemeye kimyasal olarak bağlanma ve dokuya özgü hücrelerle etkileşimler
	Farmakolojik olarak aktif moleküller	İmplant yüzeylerine doğrudan tutunma ya da kaplama içine katkı ve salım

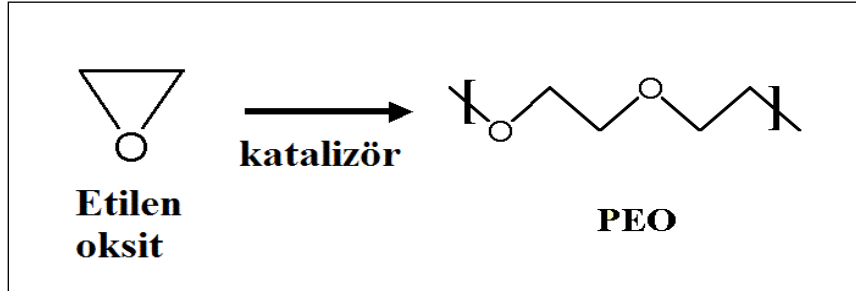
Titanyum implant yüzeylerine çeşitli büyüme faktörü ve biyoaktif peptitler immobilize edilerek osseointegrasyonun artırılması amaçlanmıştır. Kalsiyum fosfat seramikleri (CaP); kemik dokunun mineral fazı ile aynı özelliklerine sahip olan, biyobozunur, biyoaktif ve osteokondüktif sentetik malzemelerdir. CaP seramiklerinin mekanik dayanımlarının düşük olması sebebiyle, yük taşıyan uygulamalarda implant malzemesi olarak kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle CaP seramikleri, kemik doku ile bağlantı sağlayabilecek uygun yüzeyler üretilebilmesi için biyomedikal implantlarda kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır [71]. HA implant yüzey kaplamaları implant yüzeyi ve kemik arasındaki etkileşimleri desteklemekte, osseointegrasyonu arttırmaktadır. Doğal kemik yapısında bulunan HA, yapısında pek çok iyon bulundurmaktadır. Yapılan çalışmalarda implant malzemelerinin hücre farklılaşması ve kemik oluşumunun desteklenmesi ve osseointegrasyonun sağlanması için çeşitli (Sr, F, Al³⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ ve Y³⁺, La³⁺, In³⁺ ve Bi³⁺) iyon katkılı hidroksiapatit üretimleri gerçekleştirilmektedir [72]. İyon katkılı hidroksiapatitlerden çalışmanın ilerleyen basamaklarında bahsedilecektir.

Titanyum implant yüzeyleri, malzeme çevresindeki kemik iyileşme sürecini hızlandırmak için, büyüme faktörleri gibi kemik uyarıcı ajanlarla kaplanırlar. Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) süper ailesi üyeleri, özellikle kemik morfojenik proteinleri (BMP), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1 ve 2), Ti malzemelerin kaplanması için kullanılan kemik uyarıcı ajanlardır [71]. BMP'ler Ti yüzeylerine immobilize olabilmeye yetenekleri sayesinde pek çok oral ve maksillofasiyal cerrahi implant malzemelerinde kemik düzenleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda BMP'lerin implant çevresinde kemik oluşumunu uyardığı gözlemlenmiştir. BMP-2 kemik morfojenik proteinleri arasında en yüksek osteoindüktif özelliğe sahiptir ve osseointegrasyona etkisi pek çok *in-vivo* çalışma ile desteklenmiştir. BMP-2 kovalent bağ ile metalik malzemelere bağlanabilmekte ve kemik oluşumunu desteklemektedir [73].

Biyomalzemelerin yüzeylerinde hücre kontrolü ve doku cevabını kontrol etmek için çeşitli biyomoleküllerin immobilizasyonu gerçekleştirilerek etkileri incelenmektedir. Osseointegrasyonu desteklemek amacıyla yüzey kaplamalarında doku rejenerasyonu ve tamirinde önemli role sahip olan, ECM proteinlerinden kollajen tip 1 kullanılabilmektedir. Kollajen tip 1'in kalsiyum fosfat ile kompozit kaplamalarda kemik oluşumunu arttırdığı ve kemik ile implant arasında fiksasyonu desteklediği gösterilmiştir [74]. Hücreler yüzeylerindeki integrin reseptörleriyle, fibronektin, laminin, vitronektin, kollajen tip1, osteopontin ve kemik siyaloproteinleri gibi pek çok plazma ve ECM proteinlerinin yapısında bulunan spesifik aminoasit dizilimleri arasında bağlantı kurarak yüzeylere yapışmakta ve yayılmaktadır [75]. Evrensel hücre tanıma motifleri olarak isimlendirilen RGD özel amino asit dizilimleri; kendi ana moleküllerine (Fibronektin, vitronektin vb.) göre çok daha küçük yer kaplamakta, sentetik olarak üretilebilmekte ve yüksek moleküler ağırlıklı proteince göre sıcaklık ve pH gibi etkilerle denatürasyona karşı daha fazla direnç göstermektedirler [76]. RGD peptitleri; hücre yapışmasını desteklemek amacıyla implant yüzeylerinde kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır [75, 77]. Çeşitli amino asit dizilimlerinin, Ti yüzeylerine hidroksil-, amino-, karboksil-, fonksiyonel grupları ile kovalent bağlanarak malzeme yüzeyinde erken kemik oluşumunu, matriks mineralizasyonunu desteklediği ve implant ile kemik bağlanmasını uyardığı, yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [74].

2.2. Polietilen Oksit

Polietilen oksit (PEO) veya polietilen glikol (PEG), geniş bir molekül ağırlığı aralığına sahip sentetik bir poliesterdir. $(OCH_2CH_2)_n$ genel formülü ile gösterilir. n;oxy-etilen gruplarının ortalama sayısını ifade eder. Etilen oksit iki köşesinde -CH₂- molekülleri bulunan, üçüncü köşesinde ise oksijen (O) atomu bulunan bir epoksit halkasıdır. Bu monomer bir katalizör varlığında tekrar ünitesi olan bir zincir oluşturur (-CH₂-CH₂-O-) [78].



Şekil 2.7. Polietilen oksit sentezi

Polietilen oksit (PEO), etilen oksitin iyonik olmayan homopolimeridir. Molekül ağırlığı 100,000 g/mol'den küçük olanlar genellikle PEG olarak adlandırılırken daha yüksek molekül ağırlığında olanlar PEO olarak sınıflandırılır ve molekül ağırlığı 8.000.000 g mol⁻¹ değerine kadar çıkabilir [78]. Şekil 2.7'da PEO'in sentezi şematik olarak gösterilmiştir. Şekil 2.8'de ise PEO'nun kimyasal yapısı ve farklı moleküller ağırlıklara sahip PEO'nun fiziksel görünüşleri bulunmaktadır.



Şekil 2.8. a) PEO'nun kimyasal yapısı, b) (MA:400, 600, 3350 g mol⁻¹) ve c) Molekül ağırlıklarına göre değişen PEG/PEO polimerinin fiziksel görünüşleri (MA: 600000 g mol⁻¹) [79].

PEO polimerleri amfifiliktir, suda ve bazı organik çözücülerde (metilen klorür, toluen, aseton, kloroform, diklorometan/dimetilformamid) çözünebilirler. Polimer ana zincirindeki elektronca zengin oksijen, su ile hidrojen bağlayıcı bir bölge sunar ve böylelikle suda çözünürlüğü önemli derecede artırır. Düşük molekül ağırlıklı ($M_w < 1,000$) PEG'ler viskoz ve renksiz sıvılarken, daha yüksek molekül ağırlıklı olanlar mum gibi veya beyaz toz şeklindedirler. Düşük toksisiteye, iyi kararlılığa ve iyi kayganlaştırıcı etkiye sahiptirler. Erime sıcaklığı 65°C ve camsı geçiş sıcaklığı -45 – 53°C arasında değişmektedir. PEO'lar kozmetik ve eczacılık ürünlerinde, gen tedavisi, antijenlerin maskelenmesi, omurilik hasarlarının ve motor nöronların tedavisi gibi pek çok klinik uygulamada kullanılmaktadır [79].

Protein ve hücre yapışmasına doğal dirençli olan PEO ve türevleri, biyomalzeme kaynaklı enfeksiyon oluşumunu engellemek amacıyla biyomedikal implant malzemelerinde kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır.

2.2.1. Polietilen Oksitin İmplant Malzemelerinde Kullanımı

Vücuda yerleştirildiklerinde implant malzemelerinin yüzeyleri; ECM, plazma proteinleri ve diğer plazma molekülleriyle kaplanır. Malzeme yüzeyine proteinlerin yapışması, doku-implant ara yüzeyinde gerçekleşen hücreyel olaylarda önemli rol oynamaktadır. Proteinler, kan ile temas eden implant yüzeyinde bazı kimyasal reaksiyonları başlatır. Proteinlerin malzeme yüzeyine yapışması, komplementer sistemi aktive ederek immün cevap oluşumuna sebep olur. İmmün sistem aktivasyonu ile malzeme yüzeyine nötrofil ve makrofajlar yapışır, superoksit anyonları ve hidrojen peroksitler gibi enzimler salarak malzeme yüzeyine yıkıcı ataklar başlatır [80]. Ayrıca protein yapışması implant yüzeyinde bakteriyel kolonizasyonu destekler. Bunun için dolaylı olarak protein yapışmasını engelleyen implant yüzey kaplamalarının yapılması implantın başarısı için oldukça önemlidir [81]. Protein ve hücre yapışmasına karşı doğal dirençli olan PEO, implant malzemelerinin yüzeylerinde biyolojik kirlenmeyi engellemek amacıyla kullanılacak kaplama malzemelerinden biridir. PEO ile modifiye edilmiş yüzeyler gama-globulin, fibrinojen gibi plazma proteinlerinin yüzeye yapışmasını engellediği gibi, mikrobiyal yapışmayı da engelleyerek biyomalzeme kaynaklı enfeksiyon oluşumunu engeller [82]. PEO ile yapılan pek çok çalışmada biyomalzeme kaynaklı enfeksiyon (BCI) oluşumuna neden olan *S. epidermidis*, *S.*

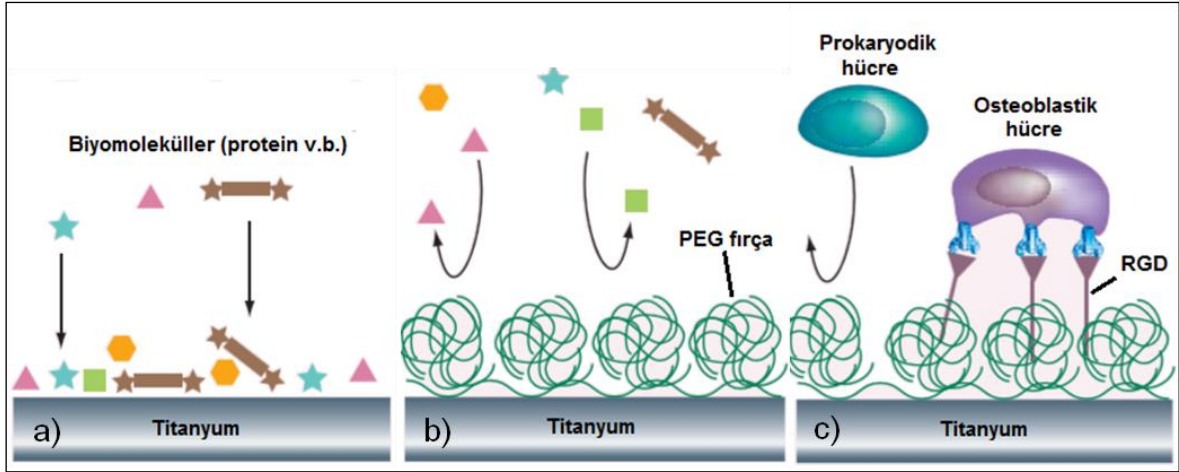
aureus, and *E. coli* suşlarının malzeme yüzeyine yapışmasını %90 oranında engellediği gösterilmiştir [4, 82-84].

PEO'nun protein ve hücre adsorpsiyonunu engelleme mekanizması tam çözülememiş olsa da, iki mekanizmayla protein ve hücre yapışmasını engellediği gösterilmiştir: 1. PEO zincirleri malzeme yüzeyindeki adsorpsiyon bölgelerini bloklayarak sterik bir itmeyle yüzeye protein ve bakterilerin yapışmasını engeller [4]. 2. Hidrofilik zincirler yüzeyde hidrasyon tabakası oluşturarak, proteinlerin yüzeye tutunmasına karşı ozmotik bir bariyer oluşturmaktadır. Zincir yoğunluğu, zincir uzunluğu, zincir konformasyonu, hidrasyon durumu, PEO tabakaların protein yapışma direncini etkileyen önemli faktörlerdir [85]. PEO kaplamalarda greftleme yoğunluğu ve zincir uzunlukları proteinlerin yüzeye tutunması ve bakteriyel yapışmasında etkilidir. PEO yüksek aşılama yoğunluklarında fırça morfolojide, düşük aşılama yoğunluklarında mantar morfolojisinde, malzeme yüzeyi ve protein molekülleri arasında sterik bir bariyer oluşturmaktadır [82].

PEO/PEG, biyomalzemelerin yüzeylerine, kimyasal tutunma, fiziksel tutunma, kovalent aşılama (grafting), vakum biriktirme ve kendiliğinden düzenlenen tek tabaka oluşturma (SAMs) metodlarıyla yüzey kaplaması olarak uygulanmaktadır. Bu kaplama yöntemlerinin bazı eksiklikleri bulunmaktadır. Fiziksel tutunma ve SAM'lar ile düşük kararlılıkta kaplamalar elde edilmektedir. Kimyasal aşılama ise çoklu basamaklar şeklinde uygulanmaktadır ve tekrarlanabilirliği düşüktür [85, 86].

2.2.2. Titanyum İmplantlarda Polietilen Oksit Yüzey Kaplamaları

İmplant başarısı için osseointegrasyonu sağlayabilmek amacıyla PEO kaplamalara çeşitli biyomodifikasyonlar uygulanmaktadır. PEO kaplamaları işlevselleştirmek için bakteri hücreleri tarafından tanınmayan ancak osteoblast hücrelerinin seçici olarak yapışmasını sağlayan RGD motifleri kullanılmaktadır [87]. Seçici peptitlerle işlevselleştirilmiş PEO kaplamaların malzeme yüzeyine peptit, bakteri ve hücre yapışmasına etkileri Şekil 2.9'de gösterilmiştir.



Şekil 2.9. PEG kaplanmış Ti substratlara protein ve hücre yapışması, a) Boş Ti yüzey, b) Polietilen glikol ile kaplanmış yüzey, b) Hücre yapışmasını destekleyen, biyomoleküllerle modifiye edilmiş PEG ile kaplanmış yüzey.

Yapılan bir çalışmada RGD-PEG ile modifiye edilmiş yüzeylerin protein yapışması, bakteriyel yapışma ve memeli hücre yapışmasına etkileri incelenmiştir. Sadece polimer kaplamaların, albumin, globulin, fibrinojen ve lizozim gibi büyük protein moleküllerinin yapışmasını önemli derecede azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca RGD ile modifiye edilmiş PEG kaplamaların memeli fibroblast hücrelerini TCPS (Tissue culture polystyrene) yüzeyler kadar desteklediği gözlenmiştir [88].

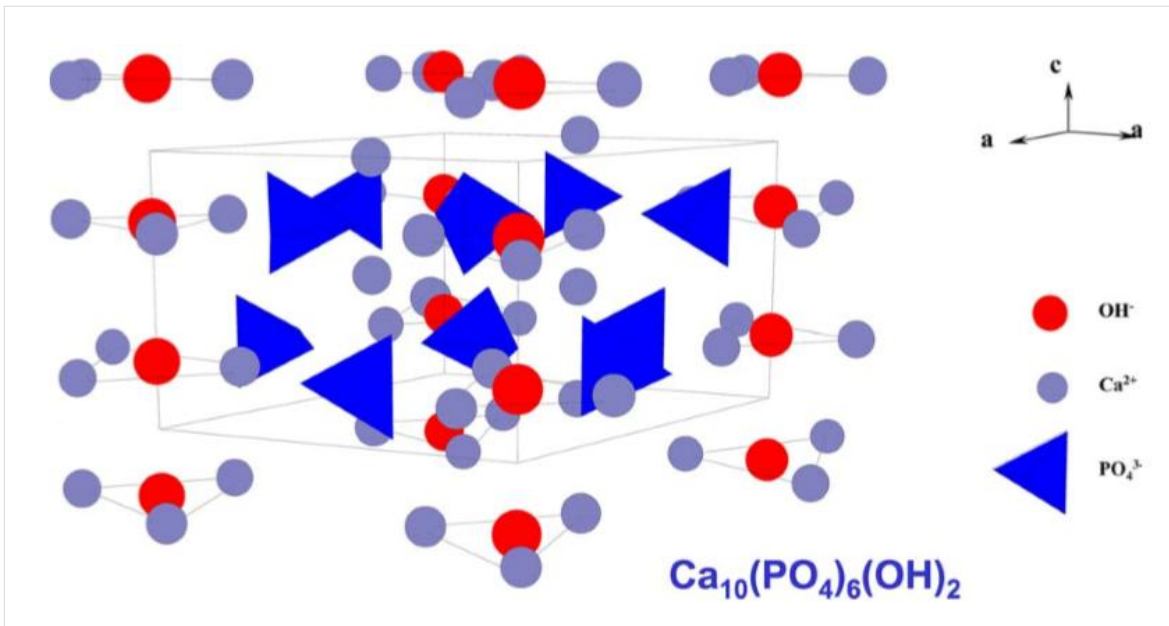
Kumlanmış ve asitle muamele edilmiş saf Ti yüzeylerine, RGDSP-peptit dizilimi ile modifiye edilmiş, protein yapışmasına karşı dirençli olan poli(L-lizin)-*graft*-poli(etilen glikol), (PLL-*g*-PEG) kaplamalar yapılmış ve serum ortamında peptit-hücre etkileşimleri incelenmiştir. Osteoblastik, fibroblastik ve epiteliyal hücrelerle yapılan *in-vitro* çalışmalarda, RGD ile işlevselleştirilmiş malzemelerde hücre yapışmasının en yüksek olduğu gözlenmiştir [89]. Germainier ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yine RGD ile işlevselleştirilmiş olan poli(L-lizin)-*graft*-poli(etilen glikol) ile kaplanmış Ti malzemelerin kemik oluşumları, minyatür domuzlarla yapılan *in vivo* çalışmalarda incelenmiştir ve RGD ile modifiye edilmiş olan yüzeylerin kemik-implant değerlerinin en yüksek olduğu gözlenmiştir [90].

Raynor ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada yapışma peptitleri ile işlevselleştirilmiş, poli[oligo (etilen glikol) metakrilat], [poly(OEGMA)], fırça yapısı ile yüzeyi modifiye edilen Ti implant malzemelerinin protein ve hücre yapışmasını nasıl desteklediği incelenmiştir. Kararlı protein yapışmasına ve hücre yapışmasına dirençli bir kaplama sağlanmış, ancak bu kaplama GFOGER (O=hydroxyproline,

G=glycine, F=phenylalanine, E=glutamic acid, and R=arginine) peptit dizilimi ile modifiye edildiğinde hücre yapışmasını desteklediği gözlenmiştir [6].

2.3. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HA), insan iskelet sisteminde doğal olarak var olan apatit ile benzer kimyasal bileşime ve kristal yapıya sahip olan biyoseramiklerdendir. Apatit yapısında olan hidroksiapatitlerin genel formülü; $M_{10}(PO_4)_6X_2$ (M: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , K^+ ve X: F^{2-} , Cl^{2-} , Br^{2-} , $(OH)^2$, CO_3^{2-}) olarak bilinmektedir. Saf hidroksiapatitin formülü ise $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 'dir [91]. Sitokiyometrik HA'nın Ca/P oranı 1.67'dir. Biyolojik apatitler sitokiyometrik Ca/P oranına sahip değildirler, zayıf kristalin yapıdadırlar. Başta karbonat olmak üzere eser miktarda katyonik ve anyonik iyonlar HA yapısına katılır. Biyolojik HA'nın yapısına en çok katılan iyon karbonat (CO_3^{2-})'tir ve kemikte ağırlıkça %5-8 arasında bulunur. CO_3^{2-} , HA yapısında bulunan bütün hidroksil (OH^-) iyonları ve bazı fosfat (PO_4^{3-}) iyonlarıyla yer değiştirebilir. OH^- iyonu ile yer değiştirmesi sonucu A tipi HA oluşurken, PO_4^{3-} iyonlarıyla yer değiştirmesi sonucu B tipi HA oluşmaktadır. Kemikte B tipi HA yaygın olarak bulunur [9].



Şekil 2.10. Saf HA kristal yapısı

Hidroksiapatitler; sol-jel yöntemi, sulu çözeltilerden çöktürme yöntemi, hidrotermal yöntem, mikrodalga-hidrotermal yöntem, çoklu emülsiyon yöntemi, elektrokristalizasyon yöntemi ve biyomimetik çöktürme yöntemi gibi birçok yöntem

ile üretilebilmektedir. Ancak bu yöntemler arasında kemiğe en yakın bileşimde HA üretimi biyomimetik yöntem ile sağlanmaktadır [9].

Biyoaktif seramik olan HA, kemik ile benzer yapısal ve kimyasal benzerlikleri nedeniyle kemik oluşumunu destekler. Hidroksiapatit kemik dokusuna yakın özelliklere sahip olmasına ve biyoaktif, osteokondüktif, non-toksik ve non-immunojenik özellikler taşımasına bağlı olarak kemik iskele ve biyomalzemelerin üretiminde dolgu maddesi olarak tercih edilmektedir [92-94]. Ancak zayıf mekanik özellikleri açısından, yüke dayanım gerektiren bölgelerde tek başına bir biyomalzeme olarak kullanıma uygun değildir. Bu nedenle, HA osseointegrasyonu arttırmak amacıyla diş ve ortopedik implant uygulamalarında kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır [95].

2.3.1. İmplant Malzemelerinde Hidroksiapatitin Kullanımı

Metalik implantlar üzerine HA kaplama için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler Çizelge 2.7’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.7. Titanyum implantlara CaP kaplama yöntemleri [74].

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj	Kaplama kalınlığı
Biyomimetik	-Kompleks şekilli malzeme kaplama -Biyomoleküllerle birlikte birikim	-pH kontrolü, -Süre uzunluğu	< 30 µm
Sol-jel	-Kompleks şekilli malzeme kaplama -Düşük işleme sıcaklığı -Biyomoleküllerle birlikte birikim	-Ortam şartlarının kontrolü -Pahalı ham madde	< 1 µm
Elektrosprey	-Kaplama bileşimi ve şeklinin Kontrolü	-Düşük mekanik dayanım	0.1-5 µm
RF Magnetron Püskürtme	-Homojen ve yoğun kaplama -Güçlü tutunma	-Düşük kaplama kalınlığı -Süre uzunluğu -Tek taraflı kaplama	0.5-5 µm
Plazma sprej	-Yüksek kaplama kalınlığı	-Kaplama kararsızlık	0.1-5 µm
Pulsu lazer	-Kaplama bileşimi ve şeklinin kontrolü	-Tek taraflı kaplama	0.05-5 µm
İyon demeti dinamik karıştırma	-Yüksek yapışma gücü	-Tek taraflı kaplama -Yüksek sinterleme sıcaklığı	0.05-1 µm
İyon demeti aracılı birikim	-Artan gerilme dayanımı	-Tek taraflı kaplama	0.05-1 µm

Bu teknikler arasında, plazma püskürtme, uygulama kolaylığı ve ekonomik olması nedeniyle en yaygın kullanılan kaplama yöntemidir. Osteokondüktif etkisi ve kemiğe bağlama davranışı pek çok çalışmayla desteklenmesine rağmen [96], bu yöntem ile elde edilen kaplamaların, metalle arasındaki bağlanma gücünde yer yer değişkenlik gösterdiği, kalınlık ve yoğunluk açısından homojen olmadığı, ayrıca HA'nın kristal yapısı ve faz bileşiminde lokal farklılıklar olduğu bildirilmiştir [74]. Bu nedenle farklı kaplama yöntemleri tercih edilmeye başlanmıştır.

Biyomimetik çöktürme yöntemi, diğer apatit kaplama yöntemleri ile karşılaştırıldığında, kolay ve hızlı olma, özel ekipmanlara ya da yüksek işleme sıcaklıklarına ihtiyaç duymama gibi bazı avantajları sebebiyle tercih edilmektedir. Biyomimetik yöntemde; insan vücut sıvısı iyon derişimine eşit olan yarı kararlı sentetik vücut sıvısı'ndan (SBF) HA üretimi gerçekleştirilmektedir. Fizyolojik pH'da ve uygun sıcaklıklarda SBF'de kendiliğinden nano boyutlu, karbonatlı ve kemik benzeri HA çekirdeklenmeleri gözlenir [97]. Ancak, SBF'nin doygunluk seviyesi nedeniyle çökeltme hızı yavaş olmakta ve osteoindüktif materyaller üzerinde Ca/P oluşumu 2-3 hafta kadar zaman almaktadır. Daha kısa sürede HA üretimi sağlanması için iyon derişimleri, kan plazmasından n=1, 5, 2, 5, 10 katı kadar fazla olan çeşitli SBF çözeltileri kullanılmaktadır [98, 99].

Özellikle Ti ve Ti alaşımı implant malzemeleri, SBF çözeltilerine daldırılarak titanyum oksit tabakası sayesinde yüzeylerine başarılı bir şekilde HA kaplamaların yapıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır [100-102].

2.3.2. İyon Katkılı Hidroksiapatitler

Biyolojik HAp yapısında Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , F^- , Cl^- ve CO_3^{2-} gibi pek çok sayıda iyon yer almaktadır. Bu nedenle, biyoaktif davranışını geliştirmek, yığın özellikleri ve mekanik özelliklerini değiştirmek amacıyla, kemik mineral faz yapısını ve bileşimini taklit eden iyon katkılı HA'ler üretilmektedir [103]. İyon katkıları, hidroksiapatit iç yapısında değişikliklere sebep olmakta ve HA boyut ve mekanik özellikleri değişkenlik göstermektedir [72]. Kalita ve Bhatt yaptıkları bir çalışmada Mg^{2+} , Zn^{2+} eklenen HA malzemelerin iyon katkısıyla mekanik dayanımlarının artmış olduğunu, ancak HA bozunma hızlarının azaldığını göstermişlerdir [104].

Kemik oluşumu ve mineralizasyonunda önemli rol oynayan çinko (Zn^{2+}), kemik oluşumunu desteklerken, osteoklast aktivitesini azaltmaktadır. Çinkonun

osteoblast hücreleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, Ti yüzey kaplaması olarak kullanılan HA yapısına başarılı bir şekilde, % 1.04 oranında katıldığı ve hücre çoğalmasını ve ALP aktivitesini desteklediği gözlenmiştir [105].

Webster ve ark., (+2)ve (+3) değerlere sahip Mg^{2+} , Zn^{2+} , La^{3+} , Y^{3+} , In^{3+} ve Bi^{3+} katkılı hidroksiapatitlerin osteoblast hücreleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Y^{3+} katkılı HA'lerin saf HA'lere göre iki kat daha fazla hücre yapışmasını desteklediği gözlenmiştir. Ayrıca +3 değerlikli iyonlar ile desteklenmiş olan hidroksiapatitlere osteoblast hücrelerinin yapışmasının daha hızlı ve fazla olduğu gözlenmiştir [106].

HA yapısına gümüş, bakır ve çinko iyonlarının katılması antibakteriyel özelliklerini arttırmaktadır [107]. Saf Ti malzeme yüzeylerine gümüş ve stronsiyum katkılı HA kaplamaların antibakteriyel özellikleri ve osseointegrasyona etkileri incelenmiştir. Ag katkısının *P. aeruginosa* bakteri suşlarının koloni oluşumunu önemli derecede azalttığı gözlenmiş, stronsiyum katkısıyla birlikte, gümüşün osteoblast hücreleri üzerinde oluşturduğu negatif sitoplazmik etkiler azaltılmış, hücre çoğalması ve farklılaşması belirgin bir şekilde artmıştır [108]. Xia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Ti implant malzemelerin yüzeyi kemik kuvvetini arttıran, kemik yıkımını azaltan, stronsiyum katkılı kalsiyum fosfat ile kaplanmıştır. Bu çalışmada biyomimetik yöntemle %10-33 oranında Sr içeren kalsiyum fosfat ile Ti yüzey kaplaması oluşturulmuştur [109]. Sr katkılı hidroksiapatit kaplamaların yapılan in vitro çalışmalarla osteoblast benzeri hücrelerin çoğalmasını desteklediği ve farklılaşmasını arttırdığı, *in-vivo* deneylerle ise Sr katkısının malzeme biyoaktivitesini ve kemik bağlanma kapasitesini arttırdığı gözlenmiştir [110, 111]. Ti malzemelerle yapılan bir diğer çalışmada, flor ile modifiye edilmiş yüzeylerin hücre farklılaşmasını ve osseointegrasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Titanyum oksit ile kaplanmış ve flor ile modifiye edilmiş yüzeyler insan mezenkimal kök hücrelerinin çoğalmasını desteklemiş ve kemik siyaloprotein, BMP-2 üretimini arttırmıştır. Sprague Dawley sıçanlarla yapılan incelemede ise implant çevresinde kemik oluşumunu desteklediği gözlenmiştir [112]. *In-vivo* ve *in-vitro* pek çok çalışmada florlanmış yüzeylerin osteoblast farklılaşmasını ve büyümesini desteklediği ve kemik oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir [28, 113].

2.3.2.1 Bor katkılı hidroksiapatit

Bor; hayvanlar, bitkiler ve insanlar için önemli bir iz elementtir. Beslenme yoluyla vücuda alınan bor, birçok metabolik enzimin aktivitesini etkilemesinin yanı sıra,

steroid hormonların ve kalsiyum, magnezyum, vitamin D gibi pek çok mikro besinin metabolizmasını da etkilemektedir [114]. Bor, osteogenez ve kemik iyileşmesinde önemli görev almaktadır. Yapılan hücre kültür çalışmalarında borun kemik öncülü hücrelerinin farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir [115]. Hidroksiapatitlere yapılan iyon katkıları arasında, bor katkılı hidroksiapatitler de bulunmaktadır. Bor, hidroksiapatit yapısına, $Ca_{10}\{(PO_4)_{6-x}(BO_3)_x\}\{(BO_3)_y(BO_2)_z(OH)_{2-3y-z}\}$ sitokiyometride, fosfat (PO_4^{-3}) ve hidroksil (OH) grupları ile yer değiştirerek katılmaktadır [116].

Barhein ve arkadaşları tarafından yüksek sıcaklık katı hal reaksiyon yöntemi ile bor katkılı kristalin yapıda HA üretimi gerçekleştirilmiştir. İn vitro biyobozunma deneylerinde bor katkılı olan HA'ların β -trikalsiyum fosfat ve HA'ya göre daha hızlı bozunduğu gözlenmiştir [117]. Hayakawa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ıslak kimyasal yöntemle ve sonrasında ısı uygulamalarıyla, bor katkılı HA üretimi gerçekleştirilmiş ve HA mikroyapısı incelenmiştir. Üretilen HA yapısındaki Ca/P oranı 1.60, bor miktarı ise %0.4 olarak bulunmuştur. Isı uygulamasıyla birlikte borun HA kafes yapısına katıldığı gözlenmiştir [118]. Yapılan bir başka çalışmada, asit bazlı kimyasal reaksiyonla borlu HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Bor katkılı HA'ler mezenkimal kök hücrelerin yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemiştir. Çalışmanın sonunda bor katkılı HA'lerin kemik doku rejenerasyonunda ve osteoporoz tedavilerinde kullanılabileceği yorumu yapılmıştır [119].

Grubumuzda daha önce yapılan bir çalışma kapsamında mikrodalga uygulaması ile desteklenmiş biyomimetik yöntem kullanarak, amorf yapıda ve karbonat oranlarıyla doğal kemik yapısına benzer bor katkılı HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Ardından bor katkılı hidroksiapatit-kitosan (B-HAp/Kitosan) kompozit doku iskeleleri hazırlanmış ve bor katkısının HA'nın osteoindüktif etkisini güçlendirdiği MC3T3 hücreleri ve mezenkimal kök hücrelerle yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [9, 120].

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında kullanılan malzemeler ve gerçekleştirilen deneysel yöntemler açıklanmıştır. Çalışmanın birinci aşamasında titanyum (Ti) malzemelerin yüzeyleri uygun zımparalama işlemleri ve ardından, asit muamelesi ile pürüzlendirilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, yapay vücut sıvısından (SBF) biyomimetik yöntemle hidroksiapatit (HA) ve bor katkılı HA (B-HA) üretimi gerçekleştirilmiş, Ti malzemelerin yüzeyleri bu HA nanopatiküllerle desteklenmiş, eğirilmiş polietilen oksit (PEO) fiberlerle kaplanmıştır. PEO çözeltisine eklenecek olan HA miktarı ve fiber özellikleri belirlenmiş ve ardından MC3T3 preosteoblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen hücre kültürü ile kaplamanın osteoblastik hücre davranışlarına etkisi incelenmiştir. Çalışmanın en son basamağında biyofilm oluşturan ve oluşturmayan iki farklı bakteri suşu, *S. epidermidis* (ATCC 35984), *S. epidermidis* (ATCC 12228) kullanılarak antibakteriyel çalışmalar yapılmıştır.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Titanyum %99.98 saflıkta, 0.24 mm kalınlığındaki şeritler şeklinde BAĞ-SAN Titanyum Metal (Türkiye) firmasından satın alınmış ve 1x1cm'lik kare plakalar şeklinde kesilmiştir. Titanyum plakaların yüzey pürüzlendirilmesinde kullanılan nitrik asit (HNO_3) ve hidroklorik asit (HCl), Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Ti malzemelerin yüzey pürüzlendirmesinde ve bor katkılı HA hazırlanmasında, pH'nın ayarlanması için kullanılan sodyum hidroksit (NaOH), Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

PEO fiberlerin üretiminde kullanılan molekül ağırlığı $M_v: 600,000 \text{ g mol}^{-1}$ olan, PEO ve PEO fiberlerin çapraz bağlanmasında kullanılan pentaeritritol triakrilat (PETA), Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır. PEO fiberlerin çapraz bağlama işlemi için 12 Watt'lık 366 nm dalga boyunda ışıma yapan UV lamba (UV12) kullanılmış ve bu lamba GLT Gase-und Labortechnik (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

SBF hazırlanmasında kullanılan tuzlardan potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), magnezyum klorür heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), Merck (Almanya) firmasından, sodyum klorür (NaCl), Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, borik asit (H_3BO_3),

BDH Chemicals Ltd. (İngiltere) firmasından, sodyum bikarbonat ise (NaHCO_3), Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Hidroksiapatitlerin yıkanmasında, titanyumların temizlenmesi ve sterilizasyon işlemlerinde kullanılan etanol (%96), Colony Sugar Mills (Pakistan) firmasından satın alınmıştır.

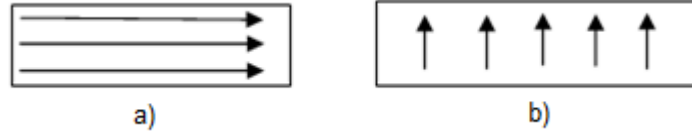
Hücre kültür çalışmalarında kullanılan MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı, Riken hücre bankasından (Tsukuba, Japonya) temin edilmiştir. Hücre kültüründe kontaminasyonu engellemek amacıyla kullanılan antibiyotikler; penisilin-streptomisin, Biological Industries (İsrail) firmasından satın alınmıştır. Yine hücre kültüründe preosteoblast hücrelerinin farklılaşma ortamında kullanılan, β -gliserol fosfat ve askorbik asit ise Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücre canlılığının takibinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT) ve izopropanol Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücrelerin fiksasyonunda kullanılan gluteraldehit, Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin ölçümünde kullanılan Triton X-100, Merck (Almanya) ve 2-amino-2-metil-1,3-propanol Sigma-Aldrich (Almanya), ise Merck (Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Hücrelerden RNA izolasyonunda kullanılan Trizol ise Ambion (ABD) firmasından satın alınmıştır.

Antibakteriyel çalışmada kullanılan *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) bakteri suşları, (Kwick-stick) Microbiologics, (ABD) firmasından temin edilmiştir. Bakterilerin çoğaltılması ve kültür çalışmaları sırasında kullanılan Mueller-Hinton Agar ve Mueller-Hinton Broth, Becton Dickinson (Fransa) firmasından sağlanmıştır.

3.2. Titanyum İmplant Malzemelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.2.1. Titanyum Malzemelerinin Yüzey Hazırlıklarındaki Ön İşlemler

Titanyum plakaların yüzeylerinde mikron boyutta pürüzler oluşturmak, yüzeyde olan kirlilikleri uzaklaştırmak ve standart yüzey elde edilebilmesi için öncelikle 280 numara, daha sonra ise 400 numaralı zımpara kağıtları ile malzemelerin yüzeyleri Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi, çift yönlü olarak 5'er dakika zımparalanmıştır.



Şekil 3.1. Titanium plakaların zımparalanma yönleri, a) ilk zımparalama yönü, b) ikinci zımparalama yönü

Zımparalama uygulaması sırasında Ti malzemelerin yüzeylerinde oluşan kirliliklerin uzaklaştırılması amacıyla, zımparalanmış plakalar, %95'lik etanol içerisinde 15 dk ultrasonikatör ile yıkanmış ve oda sıcaklığında, hava ortamında kurutulmuştur. Ti plakalar, etanol içerisinde hazırlanan, %4'lük HNO_3 çözeltisi ile muamale edilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Nitrik asit ile yapılan aşındırma işlemi ile Ti malzemelerin yüzeylerinde nano boyutta pürüzler oluşturulmuştur. En uygun aşındırma süresinin belirlenmesi için farklı gruplara 1 dk, 5 dk, 10 dk, %4'lük HNO_3 uygulanmıştır. Ti plakalar, 10N NaOH çözeltisi içerisinde, 24 sa 60°C 'de bekletilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından 10N HCl çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 1 sa bekletilmiş ve kurutulmuştur. Ti malzemelerin yüzeyleri, 0.1M HCl içeren distile su ile çalkalanarak 3 kere yıkanmış, oda sıcaklığında kurutularak yüzey kaplamaları için hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Ön işlemler uygulanmış, farklı sürelerde asit (1dk, 5dk, 10dk HNO_3 uygulaması) ile muamele edilmiş Ti plakaların yüzey topografilerinin belirlenmesi için Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM, Vecoo Multi Mode V-AS-12) ile tıklama modunda (tapping mode) çalışılarak yüzeylerin iki boyutlu ve üç boyutlu görüntüleri elde edilmiştir.

3.2.3. Su Temas Açısı Ölçümleri

Ön işlemler uygulanmış, farklı sürelerde asit (1dk, 5dk, 10dk HNO_3 uygulaması) ile muamele edilmiş ve asit uygulanmamış Ti plakaların statik su temas açısı ölçümleri, Krus DSA 100 (Almanya) marka cihaz ile oda sıcaklığında, asılı damla (sessile drop) yöntemi ile yapılmıştır.

3.2.4. Pertometre Analizi

Ön işlemler uygulanmış, farklı sürelerde asit (1dk, 5dk, 10dk HNO₃ uygulaması) ile muamele edilmiş Ti plakaların, yüzey pürüzlülük değerlerinin belirlenmesi için pertometre (Mahr, M2, ABD) kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak boş Ti ve yalnızca zımparalanmış Ti gruplar kullanılmış ve yüzey muameleleri yapılmış grupların yüzey pürüzlülükleri ile karşılaştırılmıştır.

3.2.5. Ti malzeme yüzeyinde HA oluşumu

Ön işlem uygulamaları yapılmış (5 dk HNO₃) uygulanmış olan Ti plakaların biyoaktivitelerinin incelenmesi amacıyla Bölüm 3.3.3'de bahsedilen 10XSBF çözeltisi hazırlanmış ve Ti plakalar bu çözelti içerisine batırılarak yüzeyleri HA ile kaplanmıştır. Bu çalışmada 4 farklı yüzey kaplaması üretilmiştir. Hazırlanan gruplar;

- 1) 18 saat HA kaplama
- 2) 24 saat HA kaplama
- 3) 18x2 saat HA kaplama
- 4) 18x3 saat HA kaplama

Birinci ve ikinci grubun hazırlığında, Ti plakalar 10xSBF içerisine batırılarak oda sıcaklığında, 18 saat ve 24 saat süreyle bekletilmiş ardından örnekler yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Üçüncü ve dördüncü gruplar 18 saat'lik döngüler tekrarlanarak hazırlanmıştır. SBFiçerisinde 18 sa bekletilen Ti plakalar önce distile su ile yıkanmış, ardından taze SBF içerisine batırılmış ve yüzeylerinde daha kalın bir apatit tabakası oluşumu sağlanmıştır. Ardından Ti plakaların yüzeyinde oluşan apatit çekirdeklerin dağılımı ve morfolojilerinin incelenmesi amacıyla altın-paladyum ile kaplanarak SEM cihazında (Zeiss Evo 50, Almanya) incelemeler yapılmıştır.

3.3. Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Hidroksiapatitlerin üretiminde, Maviş ve ark. tarafından hazırlanan insan kan plazmasındaki kalsiyum ve fosfat iyon derişimlerinin 10 katına sahip olan 10XSBF çözeltisi kullanılmıştır [98]. Çizelge 3.1.'de verilen 10XSBF reçetesi, Ca/P çekirdeklenmelerinin daha hızlı gerçekleşmesini sağlamaktadır.

Çizelge 3.1. 10xSBF çözelti reçetesi (Toplam hacim 1L)

Sıra	Bileşen	Miktar (g)	Molarite [mM]
1.	NaCl	58.443	1000
2.	KCl	0.373	5
3.	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.675	25
4.	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.016	5
5.	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.250	3.62
6.	*NaHCO ₃	0.840	10

*100 mL SBF için

Çalışma kapsamında biyomimetik yöntemle 3 farklı HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Örnek gruplarından ikisi; 10XSBF kullanılarak mikrodalga desteğiyle çöktürülen HA ve bor katkılı HA partikülleridir. Bu işlemlerde grubumuz tarafından daha önceki çalışmalar kapsamında gerçekleştirilen proses parametreleri kullanılmıştır [9]. Son grup için ise yine 10XSBF kullanılmış ancak mikrodalga enerjisi uygulanmadan Ca/P çekirdeklenmeleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 Mikrodalga Destekli Biyomimetik Yöntemle HA Partiküllerin Üretimi

Çizelge 3.1.'deki 10XSBF reçetesinde bulunan ilk beş tuz, 800 mL distile su içerisinde çözülmüş ve son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Bu stok çözelti çöktürme öncesine kadar oda sıcaklığında ya da +4°C'de saklanabilmektedir.

Çöktürmeyi yapmadan önce 100 mL stok çözelti içerisine 0.084 g NaHCO₃ eklenerek (konsantrasyonu 10mM olacak şekilde) mikrodalga enerjisi uygulanmış ve HA kristallerinin oluşturulması sağlanmıştır. Mikrodalga enerjisi (Milestone, İtalya) fırın içerisinde 600 W güç, 30 s süreyle, 9 kere uygulanmıştır. Bu şekilde üretilen HA partiküller "M-HA" olarak adlandırılmıştır.

3.3.2. Mikrodalga Destekli Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı HA Partiküllerin Üretimi

1000 mL ultra saf su içerisine 10g borik asit eklenerek karıştırıldıktan sonra çökeltme için uygun pH'yı (pH 6.5-7.4) sağlayabilmek için NaOH eklenmiştir. Çizelge 3.1'de belirtilen ilk beş tuz distile su içerisinde çözülerek bor katkılı HA üretimi için stok çözelti hazırlanmıştır.

Çöktürme işleminden önce 100 mL stok çözelti içerisine 0.084 g NaHCO₃ eklenmiş (konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde) ve yukarıda belirtilen koşullarda mikrodalga enerjisi uygulanarak bor katkılı CaP (B-HA) kristallerinin oluşturulması sağlanmıştır.

3.3.3 Biyomimetik Yöntemle Oda Sıcaklığında HA Partiküllerin Üretimi

Çizelge 3.1'de gösterilen 10xSBF reçetesindeki ilk beş tuz ultra saf su içerisinde çözülmüş ve daha sonra hacim ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlanmıştır.

Çökme öncesinde yine 100 mL stok çözelti içine, konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde NaHCO₃ eklenerek, hava ile temas edecek şekilde, 18 sa boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çekirdeklenmelerin oluşması sağlanmıştır. Bu gruptaki HA partiküller "O-HA" olarak adlandırılmıştır.

Üretilen tüm HA (M-HA, B-HA, O-HA) partiküller, istenmeyen fazların uzaklaştırılması amacıyla iki defa distile su ile, bir defa %96'lık etanol ile her defasında 13000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek yıkanmış ve 37°C'de bir gece boyunca kurutulmuştur.

3.4 Titanyum İmplant Malzemelerinin HA İçeren PEO Nano-fiberlerle Kaplanması ve Karakterizasyonu

Polietilen oksit fiber üretimi için grubumuzca daha önce gerçekleştirilen bir çalışma kapsamında belirlenen elektroçirime parametreleri kullanılmıştır [79]. Moleküler ağırlığı, 600,000 g mol⁻¹ olan PEO, %4 (w/v) oranında distile su içerisinde 1 gece boyunca karıştırılarak polimer çözeltisi hazırlanmış ve Çizelge 3.2'de belirtilen miktarlarda HA partiküller eklenerek 72 sa boyunca manyetik karıştırıcıda, sabit hızda karıştırılmıştır. Elektroçirime işleminden hemen önce çapraz bağlayıcı olan PETA %10 (w/w) oranında eklenmiş ve 1 sa karıştırılmıştır. Akış hızı 0.4 mL/sa değerinde tutulup, 18kV elektriksel alan altında, şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 23 cm iken, karanlık ortamda elektroçirime işlemi gerçekleştirilmiştir. (1x1cm) boyutlarında hazırlanmış Ti plakalar toplayıcıda konumlandırılmış ve yukarıda belirtilen koşullarda yüzeylerinin HA içeren PEO fiberlerle kaplanması sağlanmıştır. Uygun HA oranının ve kaplama sürelerinin belirlenmesi için Çizelge 3.2'de gösterilen oranlarda çeşitli denemeler yapılmış ve yapılan karakterizasyonlar ile en uygun değerler belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Ti plakaların HA içeren PEO fiberlerle kaplama koşulları.

Kullanılan HA tipi	HA oranları (%w/w)	Kaplama süreleri (dk)	Akış hızı (mL/sa)	Mesafe (cm)
M-HA	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20	5, 10, 15	0.4	23
B-HA	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20			
O-HA	3, 4, 5, 10, 15, 20			

PEO ile kaplanan Ti plakalar 8 gün boyunca 37°C'de kurutulmuş ve 4 cm uzaklıktan, 50 dk boyunca UV12 ışık kaynağı ile muamele edilerek çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Çapraz bağlı PEO nanofiberler ile kaplanmış olan Ti malzemelerin yüzey morfolojileri ve fiziksel yapıları SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) ile analiz edilmiştir. Görüntüleme öncesi örneklerin yüzeyi altın tabakası ile kaplanmıştır. PEO ve HA/PEO fiberlerin ortalama çapları, ImageJ yazılımı ile SEM görüntülerinden hesaplanmıştır.

Ayrıca sıvı ortamda fiber davranışlarının incelenmesi amacıyla PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti ve O-HA/PEO/Ti grupları hazırlanmış ve 30 dk etanolde sterilendirilerek, α -MEM, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren kültür ortamına alınmış ve 3 gün boyunca, 37°C'de bekletilmiştir. Üç günün sonunda Ti plakalar 37°C'de kurutularak yüzeyleri altın-paladyumla kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

3.4.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

PEO fiberlerin içerisine hapsolmuş HA nanopartikül morfolojileri ve dağılımları, yüksek geçirimli elektron mikroskobu (FEI Tecnai G² Spirit BioTwin CTEM) ile görüntülenmiştir. Holey karbon ızgaralar (Grid) üzerine 15-20 s, Bölüm 3.4'te açıklanan koşullarda eğirme işlemi gerçekleştirilerek örnekler hazırlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır.

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Ti plakaların osteojenik farklılaşma kapasiteleri, MC3T3-E1 fare preosteoblast hücre hattı kullanılarak *in-vitro* hücre kültürü çalışmaları ile belirlenmiştir. Onbirinci pasajda dondurulmuş olan hücreler önce flasklarda %10 (v/v) FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM kültür ortamı içerisinde çoğaltılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında kullanılan örnekler şunlardır;

1. Ön uygulama yapılmamış saf titanyum (Ti),
2. Ön uygulama yapılmış ve PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (PEO/Ti),
3. Ön uygulama yapılmış ve mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (M-HA/PEO/Ti),
4. Ön uygulama yapılmış ve bor katkılı HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (B-HA/PEO/Ti),
5. Ön uygulama yapılmış ve oda sıcaklığında, mikrodalga desteği olmadan üretilen HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (O-HA/PEO/Ti).

Ti plakaların sterilizasyonları 30 dk, %70'lik etanol ve 30 dk UV ışını ile muamele edilerek gerçekleştirilmiştir. Ti plakalar sterilizasyon işleminden sonra etanolün uzaklaştırılması için steril PBS ile yıkanmış ve malzemelerin serum proteinleri ile etkileşimi için 1 sa, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamı içerisinde 37°C'de bekletilmiştir. Laminer akışlı kabinde (Bioair, Tip II Laminer Akışlı Kabin, İtalya) her bir örnek yüzeyine, %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamında hazırlanan 10 μ L, 1x10⁴ hücre mL⁻¹ derişimdeki hücre süspansiyonu eklenmiştir. Kültür kapları %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava karışımı sağlayan inkübatöre (Heraus Instruments, Almanya) kaldırılmıştır. Yirmidört saat sonra Ti plakalar üzerinde bulunan besi ortamı çekilerek, 10 mM β -gliserol fosfat ve 50 μ g/mL askorbik asit içeren osteojenik farklılaşma ortamı eklenmiştir. Kültür süresi boyunca Ti plakaların bulunduğu ortam 2 günde bir yarı yarıya değiştirilerek tazelenmiş ve hücre kültür çalışmaları 28 gün boyunca sürdürülmüştür.

3.5.1. MTT Analizi

Titanyum plakaların yüzeylerinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı, kültürün 1, 7, 14 ve 28 inci günlerinde, metabolik aktivite ölçümü yapılan MTT analizi ile belirlenmiştir. MTT analizi, mitokondriyal aktiviteleri devam eden canlı

hücrelerin sarı renkte olan tetrazolyum tuzlarını, suda çözünmeyen renkli formazan kristallerine dönüştürmesi sonucu kalorimetrik olarak hücre miktarının kantitatif olarak belirlenmesine dayalı olan bir yöntemdir. Titanyum plakaların üzerinde bulunan kültür ortamı uzaklaştırılarak her plaka üzerine 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL sarı renkte olan MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Üç saat 37°C'de inkübasyondan sonra ortamlar uzaklaştırılmış ve örnekler başka 24 gözlü kültür kaplarına aktarılmıştır. Her göze 400µL, 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Mor renkte olan çözülden 200µL alınarak 96 gözlü kültür kaplarına aktarılmış ve 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de, mikroplaka okuyucu (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader, Avusturya) kullanılarak spektrofotometrede absorpsiyon ölçümü yapılmıştır.

3.5.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi

Hücrelerin Ti malzemelerin yüzeylerindeki morfolojileri ve hücre-hücre etkileşimleri, SEM (ZeissEvo 50, Almanya) ile görüntülenmiştir. Kültürün 7 inci ve 28 inci günlerinde örneklerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve plakalar farklı 24 gözlü kültür kaplarına alınarak iki kez PBS (pH:7.4) ile yıkanmıştır. Hücrelerin fiksasyonunu gerçekleştirmek amacıyla Ti plakalar % 2.5'lük (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile 30 dk boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta muamele edilmiştir. Örnekler analize kadar PBS içerisinde 4°C'de saklanmıştır. SEM analizinden önce, Ti plakalar sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (v/v) etanol çözeltilerinde 2'şer dk bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ti plakalar, daha sonra heksametildisilazan (HMDS) içerisinde 5 dk muamele edilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ti plakalar, altın-paladyum ile kaplanarak SEM görüntüleri alınmıştır.

3.5.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizleri

Titanyum malzemelerin yüzeylerine tutunan hücrelerin osteojenik farklılaşmaları, RunX2, KOL-1, osteokalsin ve osteopontin gen ekspresyon seviyelerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile incelenmesi sonucu belirlenmiştir.

PCR analizleri için;

- i) Kalıp DNA,
- ii) Çoğaltılacak DNA bölgesine uygun primer dizileri,
- iii) Deoksinükleotit trifosfatlar (dNTPs),
- iv) Yüksek sıcaklıklara dayanabilen Tag Polimeraz enzimi ve
- v) Enzimin çalışması için uygun pH'yı ve iyon değişimlerini sağlayabilecek tampon çözeltisi gerekmektedir.

PCR işlemi 3 basamakta gerçekleşmektedir.

1. *Basamak*; 94-98°C sıcaklık aralığında uygulanan 'denatürasyon' basamağıdır. Bu basamakta sıcaklık artırılarak çift zincir haline bulunan DNA zincirleri, tek zincir haline getirilerek kalıp DNA'lar hazırlanmaktadır.

2. *Basamak*; Oligonükleotid primerlerin kalıp DNA üzerinde kendilerine uygun bölgelere bağlandığı 'annealing' basamağıdır. Sentezlenecek DNA bölgesine uygun olarak tasarlanan primerlerin annealing sıcaklıkları bulunmaktadır. Bu basamakta uygun sıcaklıklara düşürülerek, primer dizilerinin DNA üzerinde bağlanması sağlanmaktadır.

3. *Basamak*; DNA polimeraz enzimi ile dNTP'lerin kalıp DNA'ya göre 5'-3' yönünde arka arkaya bağlandığı 'polimerizasyon' aşamasıdır. Üç basamaktan oluşan döngüler tekrarlanarak DNA sentezlenmektedir.

Kültürün 7., 14., ve 28., günlerinde Ti plakalar kesilerek Eppendorf tüplere alınmıştır. Üstlerine 500µL Trizol eklenerek, -80°C'ye kaldırılmıştır. RNA izolasyonunun gerçekleştirileceği zaman donmuş Trizol içerisinde bekletilen Ti plakalar oda sıcaklığına getirilerek vortekslenmiştir. Üzerlerine 125µL kloroform eklenmiş hafifçe çalkalanmış ve 12,000 rpm'de +4°C'de, 10 dk santrifüjleme işlemi uygulanmıştır. Eppendorflar içerisinde oluşan sıvı faz yeni Eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra sıvı faz üzerine 250 µL %70'lik etanol eklenmiştir. Bu çözeltiler RNA için seçici olan filtreler içeren kolonlara aktarılmış ve 12,000 rpm'de 1 dk santrifüj uygulanmıştır. Kolonların alt kısmında kalan sıvı faz uzaklaştırılmış ve 700 µl RW1 tamponu eklenmiştir. 30 s, 12,000 rpm'de santrifüj uygulanarak yine kolonun altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır. Kolonların üzerine 500µL, RPE tamponu eklenerek 30 s, 12,000 rpm'de santrifüjlenmiş, kolonun altında kalan sıvı uzaklaştırılmış ve bu basamak 2 kere tekrar edilmiştir. Kolonun altında bulunan toplama tüpleri temiz tüplerle değiştirilerek 12000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir.

Toplama tüpleri ile kapaklı steril kapaklı tüpler değiştirilmiştir. 50µL, RNase free su eklenerek 1dk 12,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen RNA miktarları Nanodrop (Thermo Scientific nanodrop 2000c) ile belirlenmiş ve RNase free su eklenerek RNA başlangıç hacimleri eşitlenmiştir.

RT-PCR analizi, Applied Biosystems Kit cDNA (ABD), SolisBioDyne 5 Hot FirePol® EvaGreen®qPCRMix Plus (Estonya) kitleri ile LightCycler®Nanolnstrument (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi, reverse transkripsiyon ile 40°C'de 120 dk'da gerçekleştirilmiştir. Ardından, PCR analizi, aktivasyon basamağı 95°C'de 15 dk'da, uzatma basamağı 95°C'de 15 s, 60°C'de 20s, 72°C'de 20 s ve ayrılma basamağı 60°C'de 4s ve 95°C'de 20 s olmak üzere 45 döngüde gerçekleştirilmiştir.

“Housekeeping gen” olarak β-aktin kullanılmıştır. B-aktin, runx2, kollajen tip 1 (KOL-I), osteokalsin (OCN) ve osteopontin (OPN) genlerinin primer dizileri (MoteK, Türkiye) Çizelge 3.3'te verilmiştir. Yapılan analizin sonuçları bağıl gen ekspresyonu olarak verilmiştir. Tüm veriler $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metoduna göre hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

Çizelge 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.

Gen bölgeleri	Primer dizileri
Kollajen tip1 (KOL-1)	Forward primer 5'-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3'
	Reverse primer 5'-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3'
Osteokalsin (OCN)	Forward primer 5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG -3'
	Reverse primer 5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3'
Run X2	Forward primer 5'-GCATGGCCAAGAAGACATCC -3'
	Reverse primer 5'-CCTCGGGTTTCCACGTCTC -3'
Osteopontin (OPN)	Forward primer 5'-CACTTTCACTCCAATCGTCCCTAC-3'
	Reverse primer 5'-ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC-3'
β-aktin	Forward primer 5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'
	Reverse primer 5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'

3.5.4. Alkalen Fosfataz (ALP) Analizi

Titanyum malzemelerin yüzeylerinde bulunan MC3T3 preosteoblast hücrelerinin osteojenik farklılaşmaları ALP aktivite analizleri ile incelenmiştir. Hücre kültürünün 7.,14. ve 28 inci günlerinde Ti plakalar kesilerek Eppendorf tüplere alınmıştır. Örnekler üzerine 500µL 0.01(v/v) Triton-x-100 çözeltisi konularak çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C'de saklanmıştır. Örnekler -80°C'den alınarak oda sıcaklığına getirilmiş ve daha sonra 30 dk +4°C'de inkübe edilerek hücrelerin liziz işlemi gerçekleştirilmiştir. 12,000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. 100µL süpernatant alınarak 96 gözlü plaklara konmuş ve üstlerine 125µL ALP çözeltisi (1mM magnezyum klorür, 56mM 2-amino-2-metil-1-propanol içeren 10mL p-nitrofenilfosfat sıvı substrat sistemi) eklenmiştir. Çözelti, 37°C'de 30 dk boyunca çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Her bir örnek üzerine 50 µL, 2.5M NaOH eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. 405 nm dalga boyunda, mikropilaka okuyucuda (Asys UVM340, Avusturya) spektrofotometrik olarak p-nitrofenol absorbansı ölçülmüştür.

3.5.5. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları Graph-Pad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için *Tukey-Kramer Multiple Comparison Test* kullanılmış ve $p < 0.05$ olduğu durum istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin ortalama \pm standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

3.6. Antibakteriyel Etkinin Belirlemesine Yönelik Çalışmalar

HA ile desteklenmiş PEO fiber kaplı Ti plakaların yüzeylerine bakteri hücrelerinin tutunabilirliğinin incelenmesi amacıyla *S.epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35984) suşları kullanılmıştır. Bakteri kültür çalışmalarında kullanılan örnekler şunlardır;

1. Ön uygulama yapılmamış saf titanyum (Ti),
2. Ön uygulama yapılmış ve PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (PEO/Ti),
3. Ön uygulama yapılmış ve mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (M-HA/PEO/Ti)

4. Ön uygulama yapılmış ve bor katkıli HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (B-HA/PEO/Ti),
5. Ön uygulama yapılmış ve oda sıcaklığında mikrodalga desteği olmadan üretilen HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (O-HA/PEO/Ti).

Ti plakalar 24 gözlü kültür kapları içerisinde, 30 dk %70'lik etanol ve 30 dk UV ile muamele edilerek sterilize edilmiştir.

Dondurulmuş bakteri suşları, Blood Agara ekilerek 1 gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Blood Agar üzerinde oluşan koloniler, Mueller Hinton Agar dökülmüş olan Petrilere tek koloni şeklinde ekilerek, 1 gece 37°C'de inkübe edilmişlerdir. Oluşan tek kolonilerden Mueller Hinton Broth içerisinde gecelik bakteri sıvı kültürleri hazırlanmış ve 1 gece 37°C'de inkübe edilerek bakterilerin logaritmik üreme fazına geçmeleri sağlanmıştır. Gecelik kültürlerden Mueller Hinton Broth içerisinde, MacFarland 0.5 standartlarına göre bakteri çözeltileri hazırlanmıştır. Spektrofotometre ölçümleri ile her bakteri suşu için, 600 nm dalga boyunda 0.1 absorbans veren ve 1×10^8 cfu/mL bakteri konsantrasyonu içeren sıvı hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 1 kez 1:150, 1 kez 1:2 seyreltilerek, 5×10^5 bakteri konsantrasyonları elde edilmiştir.

3.6.1. Yapışma Analizi

24 gözlü kültür kapları içerisinde sterillenen Ti malzemelerin yüzeylerine 1mL 5×10^5 cfu bakteri içeren hücre süspansiyonu eklenerek, 2 sa boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Bakteri süspansiyonu uzaklaştırıldıktan sonra Ti plakalara tutunmayan bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla 3 kere 500µL serum fizyolojik (%0.9'luk NaCl) ile yıkanmıştır. Plakalar 1 mL steril serum fizyolojik içerisine alınarak vorteks ile karıştırılmış ve yüzeye yapışan hücrelerin çözelti içerisine geçmeleri sağlanmıştır. Farklı oranlarda seyreltimeleri yapıldıktan sonra bakteri içeren çözeltiden 100 µL alınarak, 2mL üst agar içerisine karıştırılıp önceden hazırlanmış Mueller Hinton Agar bulunan Petrilere dökülmüştür. Petri kapları 37°C'de 1 gece inkübe edilerek koloni sayımları yapılmış ve Ti yüzeylerine yapışan bakteri sayıları hesaplanmıştır.

4.DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

Bu bölümde tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların sonuçlarından bahsedilmiş ve bulgular üzerine tartışmalar yapılmıştır. İlk olarak, titanyum implant yüzeylerine yapılan ön uygulamalar ve karakterizasyon sonuçları incelenmiştir. İkinci kısımda ise osseointegrasyonu desteklemek amacıyla kullanılacak olan HA nanopartikül üretimleri ve malzemelerin özellikleri ayrıntılı bir şekilde tartışılmıştır. Ardından, implant yüzeylerinin, HA içeren PEO fiberler ile kaplama yöntemi anlatılmış ve sonuçları incelenmiştir. Son kısımlarda ise yüzey kaplamalarının hem osseointegrasyona etkisi, hem de antibakteriyel etkinliği, hücre kültür çalışmalarıyla test edilmiş ve sonuçları literatür çalışmaları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

4.1 Titanyum İmplant Malzemelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Titanyum, dayanıklı ve sert yapısı, mükemmel korozyon direnci, elastik modül değerlerinin düşük olması gibi üstün mekanik özelliklerinin yanı sıra, biyouyumlu ve kemik apozisyonunu uyarabilen bir malzeme olması nedeniyle özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanım alanı bulmaktadır [2, 121]. Ti metali, implant malzemesi olarak kullanımında avantaj ve dezavantaj oluşturacak bir takım yüzey özelliklerine sahiptir. Ti hava ile temas ettiğinde, malzeme yüzeyinde kendiliğinden bir oksit tabakası oluşmaktadır. Bu tabaka malzemeye korozyon direnci ve biyouyumluluk özelliğini kazandırmasının yanı sıra hücre yapışmasını destekleyen bir özellik de sağlamaktadır. Ti implantlar, vücuda yerleştirildiğinde, çevre dokular implant yüzeyindeki TiO_2 tabakasıyla doğrudan bağlanabilme yeteneğine sahiptir [122].

Ti malzeme yüzeylerinin sahip olduğu kimyasal özellikler kemik hücrelerinin implant yüzeyine yapışmasını desteklemekte, ancak osseointegrasyonun tam olarak gerçekleşmesi için yeterli olamamaktadır. İmplant yüzey topografisi, osteoblastik hücre yapışmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre dışı matriks üretimini büyük ölçüde etkilemektedir. Tüm bu işlevlerin, Ti malzemelerin yüzey pürüzlülüğünün artmasıyla ve pürüz boyutlarının değişmesiyle etkilendiğini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır [23, 26, 123, 124]. Titanyum'un yüzey özellikleri sadece ökaryotik hücrelerin değil, diğer yandan büyük bir dezavantaj oluşturan prokaryotik hücrelerin de yapışmasını desteklemektedir. Bakterilerin malzeme

yüzeyine yapışması ve biyofilm oluşumu, implant kaynaklı enfeksiyonlara ve implant kayıplarına neden olmaktadır [125].

Titanyum implant malzemelerinin, klinik uygulamalarında karşılaşılan sorunları engellemek amacıyla, malzemelerin yüzeylerine yapılan modifikasyonlar, Bölüm 2.1.4 ve Bölüm 2.1.5'te açıklanmıştır. Tez çalışması kapsamında hem enfeksiyon oluşumunu engelleyen hem de osseointegrasyonu destekleyen yüzey kaplamaları hazırlanmıştır. Kaplama malzemesi olarak, antibakteriyel özellikte PEO fiberler ve osseointegrasyonu destekleyecek olan HA'lar kullanılmıştır. Titanyum yüzeyler kaplama öncesi Bölüm 4.1.1'de bahsedilen bir takım ön işlemlere tabii tutulmuştur.

4.1.1. Titanyum İmplant Malzeme Yüzey Hazırlıklarındaki Ön İşlemler

Sunulan tez çalışmasında, Ti malzemelerin yüzeylerinde kendiliğinden oluşan amorf titanyum oksit tabakasını ve kirlilikleri uzaklaştırmak, kaplamada kullanılacak olan fiberlerin yüzeye daha sıkı tutunmasını sağlayabilmek için bir takım ön işlemler yapılmıştır. Ti plakaların yüzey alanını arttırmak amacıyla, mekanik ve kimyasal muameleler yapılmış ve en uygun yüzey hazırlığı için çeşitli denemeler yapılarak, etkin parametreler ve uygulama koşulları belirlenmiştir.

Ti malzemelerin yüzeyinde çeşitli uygulamalarla oluşturulan pürüzlülükler, yüzeye bağlanacak kaplama tabakasına daha fazla yüzey alanı oluşturmaktadır. Yüzey alanındaki artışı, Ti-polimer arasındaki etkileşimleri ve bağlanma kuvvetini arttırarak, daha kararlı bir kaplama yapılmasına olanak sağlayacaktır [126]. Bu nedenle Ti plaka yüzeyinde, mikron boyutlu pürüzler oluşturmak amacıyla öncelikle 280 numara, daha sonra 400 numara zımpara kağıtlarıyla, 5dk süreyle iki yönlü olarak zımparalanmıştır. Zımparalama işleminin ardından yüzeyde hem mikron hem nano boyutta yapıların oluşması için Ti plakalar nitrik asit ile muamele edilmiştir. Uygulanacak olan kaplamanın kararlılığını desteklemek amacıyla 1, 5, 10 dk asit uygulaması yapılarak Ti plakalar üzerindeki etkileri incelenmiş ve AFM, temas açısı ölçümleri ve profilometre analizleri ile en uygun süre belirlenmiştir.

Asit uygulamasından sonra NaOH ve HCl muamelelerinin yapıldığı bir ön uygulama basamağı daha gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Bu basamak ile malzeme yüzeyinde titanyum oksit tabakası oluşturularak kaplama kararlılığının artırılması amaçlanmıştır. NaOH uygulamasıyla malzeme yüzeyindeki amorf TiO_2 tabaka çözülerek uzaklaşır ve arkasında sodyum titanat

tabaka kalır. Daha sonra uygulanan HCl ile apatit oluşumunu uyaran nano boyutta pürüzlü bir yüzey oluşur.

Ravichandran ve ark. [122] Ti malzeme yüzeyine yapılan asit ve alkali uygulamaların malzeme yüzey özellikleri üzerine etkilerini incelemiştir. HNO₃, NaOH ve HCl uygulamaları sonrasında, Ti yüzeylerinde, osseointegrasyonu destekleyen ve titanyumun biyouyumluluk özelliğini arttıran, başarılı bir TiO₂ tabakasının oluşturulduğunu belirtmişler ve ön uygulamalar sonrasında mikrodokulu yüzey yapısının, nanodokulu yüzey yapısına dönüştüğünü gözlemlemişlerdir.

Patannayanak ve ark. [127] NaOH ve HCl uygulaması ile hazırlanan yüzeylerin apatit oluşumuna etkilerini gözlemlemişlerdir. NaOH uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarda HCl muamelesinin, malzeme yüzeyinde apatit oluşumunu arttırdığını, daha biyouyumlu yüzeyler oluşturulduğunu ve uygulanan HCl konsantrasyonunun artmasıyla, apatit oluşum kapasitesinin arttığını ve malzeme yüzeyinde ağ formunda nano yapıların oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Yaptıkları bir diğer çalışmada ise [128] NaOH-HCl uygulamasından sonra yüzeyde oluşan TiO₂ tabakasının, ısıtma işlemi uygulaması sonrasında, anataz formundan, rutil forma geçtiğini ve 800°C'de yüzeyin tamamen rutil formda TiO₂ tabakası içerdiğini gözlemlemişlerdir.

Tez çalışması kapsamında da yapılan ön işlemlerin Ti malzeme yüzey morfolojisindeki etkileri literatüre benzer olarak çeşitli tekniklerle incelenmiş ve devam eden bölümlerde sonuçlar ve yorumları verilmiştir.

4.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Ön uygulama yapılmış Ti plakaların atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Ti plaka yüzeylerine, 3 farklı sürede asit (HNO₃) uygulaması yapılmış ve yüzey üzerindeki morfolojik, topografik değişimler incelenmiştir.

Bir dk HNO₃ (Şekil 4.1 a) uygulanmış olan Ti plakalarda yüzeyde paralel çizgiler halinde uzanan, zımparalama basamağının etkisiyle oluşan yapılar gözlenmektedir. Ancak asit uygulamasının yüzeyde etkisi çok belirgin değildir. Şekil 4.1.b'de bulunan 5 dk asit muamelesi yapılmış Ti görüntülerinde, hem zımparadan kaynaklanan oluk şeklindeki yapılar, hem de aşındırmanın etkisi

açıkça gözlenmektedir. Asit uygulama süresinin arttırılmasıyla yüzeyde nano boyutlu yapıların daha yoğun olduğu görülmüştür. On dk asit uygulanan örneklerde ise yüzey pürüzlülüğünün, 5 dk asit uygulanan örneklere göre çok daha fazla olduğu ve zımparalama ile oluşan mikron boyutlu damarlanmaların büyük oranda kaybolduğu gözlenmektedir (Şekil 4.1.c). Ayrıca pürüz boyutunun 5 dk'lık uygulamaya göre küçülmüş olduğu da dikkat çekicidir.

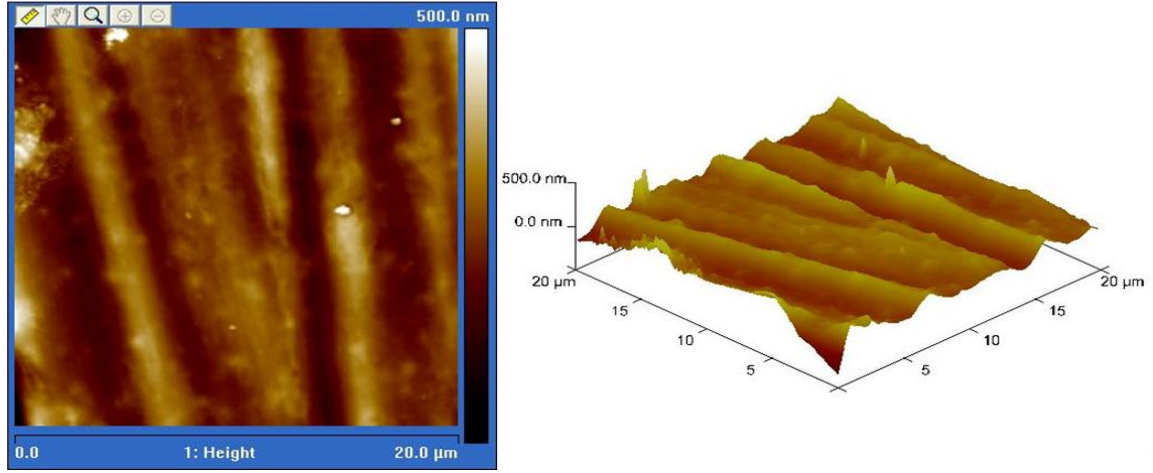
Çizelge 4.1. Zımparalama sonrası asitle muamele edilmiş ve NaOH/HCl uygulaması yapılmış Ti plakaların pürüzlülük değerleri.

Örnekler	Ra (nm)	Rq (nm)	Rmax (nm)
1 dk HNO ₃ uygulanmış Ti*	45	55.6	524
5 dk HNO ₃ uygulanmış Ti*	83.5	105	779
10 dk HNO ₃ uygulanmış Ti*	69.7	88.2	866

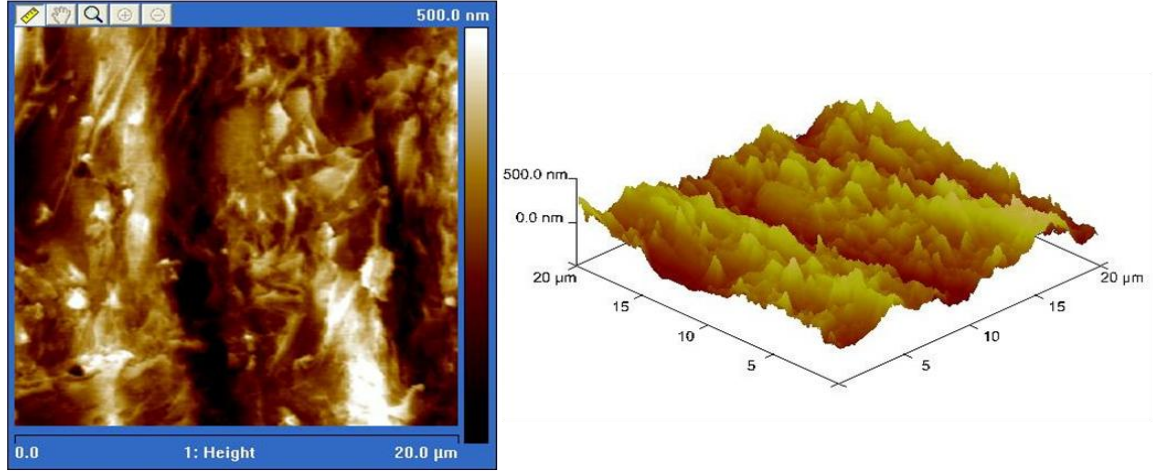
*Ti plakalar 280/400 numara zımpara ile zımparalanmış, asitle belirlenen sürelerde muamele edilmiş ve NaOH-HCl uygulamaları yapılmıştır.

Ön uygulamaları yapılmış Ti plakaların yüzey pürüzlülüğü AFM analizi ile incelenmiş ve pürüzlülük parametreleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Ra, yüzey üzerindeki dik kesiten çizilen ortalama çizginin, artı ve eksi yöndeki yükselti ve çukur ölçülerinin mutlak değerlerinin ortalamasını vermektedir ve malzeme yüzey pürüzlülüğü genellikle Ra parametresi ile ifade edilmektedir. Ra değerinin artmasıyla yüzey pürüzlülüğü artmaktadır. Ayrıca yüzey yapıları çok farklı olan malzemeler aynı Ra değerlerine sahip olabilmektedirler. Rmax yüzey üzerindeki en yüksek ve en derin noktalar arasındaki mutlak farkı göstermektedir. Rq (Rrms) değerleri ise ortalamalarının kareleri toplamının karekökünü vermektedir. AFM görüntüleri (Şekil 4.1) ve pürüzlülük değerlerinden (Çizelge 4.1) yola çıkılarak, Ra ve Rq değerleri en yüksek olan, 5 dk HNO₃ uygulanmış olan Ti plakalar tez çalışmasının diğer basamakları için seçilmiş ve PEO fiberler bu yüzeyler üzerine kaplanmıştır. Yüzey pürüzlülüğü ile ilgili daha ayrıntılı çalışmalar pertometre analizleri ile yapılmış ve Bölüm 4.1.4'de bahsedilmiştir.

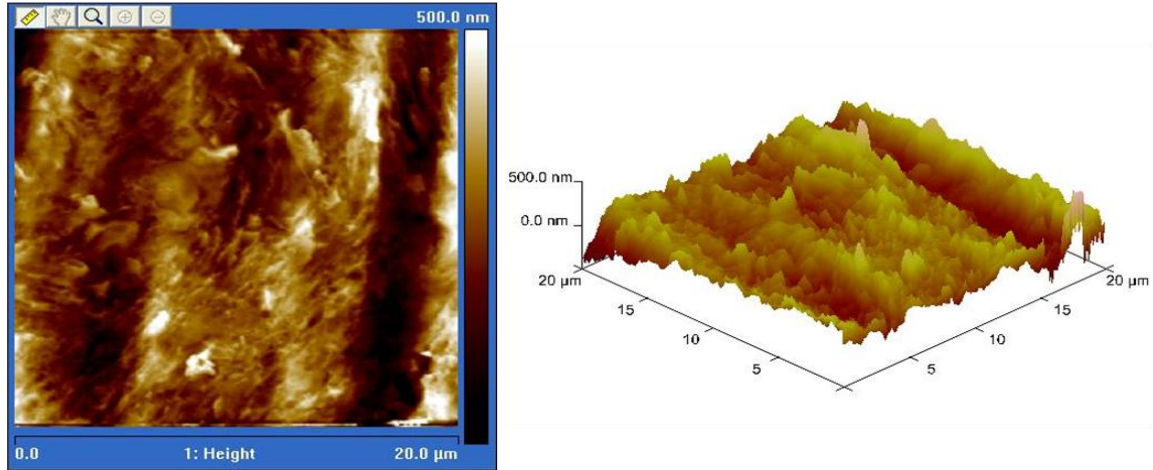
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.1. Zımparalama sonrası asitle muamele edilmiş ve NaOH/HCl uygulaması yapılmış Ti plakaların AFM görüntüleri a) 1 dk HNO_3 uygulaması, b) 5 dk HNO_3 uygulanması, c) 10dk HNO_3 uygulaması. Sol taraftaki fotoğraflar 2 boyutlu, sağ taraftaki fotoğraflar ise 3 boyutlu görüntülere aittir.

4.1.3 Pertometre Analizi

Malzeme yüzey pürüzlülük değerlerinin belirlendiği pertometre analizi Çizelge 4.2'de bulunmaktadır. Uygulama yapılmamış Ti plakaların zımparalama işleminden sonra pürüzlülük değerlerinde büyük oranda artış gözlenmektedir. AFM ve pertometre analizleri, asit uygulaması ve NaOH/HCl uygulamalarının yapılmasıyla Ra değerlerinin azaldığını göstermektedir. Pertometre analizi sonucunda farklı sürelerde asit uygulanmış olan örnekler arasında fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.2). Çizelge 4.1'de bulunan AFM analizlerinde, 20x20µm boyutunda bir alan taranmış ve Şekil 4.1'de bulunan görüntülerin pürüzlülük değerleri hesaplanmıştır. Malzeme üzerinde farklı alanlarda yapılacak ölçümlerde farklı sonuçların elde edileceği düşünülmektedir. Öte yandan pertometre ile yapılan analizlerde ise malzeme yüzeyinde büyük alanlar taranarak pürüzlülük değerleri belirlenmiştir. Bu nedenle iki farklı cihaz ile yapılan ölçümler arasında büyük oranda fark olduğu gözlenmektedir ve pertometre analizinin gerçeğe daha yakın sonuçlar yansıttığı düşünülmektedir. Her iki analizin çalışma prensipleri ve cihaz duyarlılıkları farklı olmasına rağmen, 1 dk ve 5 dk asit uygulaması yapılmış olan plakaların, yüzey pürüzlülük değişimlerinin birbirine benzer olduğu asit süresi arttıkça pürüzlülüğün arttığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Ön uygulamaları yapılmış olan Ti plakaların pürüzlülük değerleri.

Örnekler	Ra değerleri (nm)
Yüzey uygulaması yapılmamış Ti	146±22
Zımparalanmış Ti (P280/400)	277±38
1 dk HNO ₃ uygulanmış Ti*	242±34
5 dk HNO ₃ uygulanmış Ti*	255±32
10 dk HNO ₃ uygulanmış Ti*	258±32

*Ti plakalar 280/400 numara zımpara ile zımparalanmış, asitle belirlenen sürelerde muamele edilmiş ve NaOH-HCl uygulamaları yapılmıştır.

4.1.4 Su Temas Açısı Ölçümleri

Ti plakalar yüzeyinde yapışık damla metodu kullanılarak gerçekleştirilen su temas açısı ölçümlerine ait değerler Çizelge 4.3'de verilmiştir. Mekanik ve kimyasal uygulamalar sonrasında Ti plakaların su temas açısı değerlerinin düştüğü gözlenmektedir. Özellikle daha fazla nano boyutta pürüzlüğe sahip olan 5 ve 10 dk HNO₃ uygulanmış örneklerde su temas açılarının düşük olması, ön

uygulamalardan sonra malzeme yüzeyinin daha hidrofilik özellik kazandığını göstermektedir.

NaOH ve HCl uygulaması malzeme yüzeyinde anataz fazda TiO₂ tabakasının oluşumunu sağlamaktadır. Yapılan pek çok çalışma TiO₂ tabakasının malzemenin serbest yüzey enerjisini artırarak ve hidrofilik özelliklerinin arttığını göstermektedir [33, 122, 129].

Çizelge 4.3. Ti plakaların su temas açısı ölçümleri

Örnekler	Su temas açısı (°)
Yüzey uygulaması yapılmamış Ti	84.80±1.32
1 dk HNO ₃ uygulanmış Ti*	76.65±2.65
5 dk HNO ₃ uygulanmış Ti*	69.03±0.75
10 dk HNO ₃ uygulanmış Ti*	62.27±4.25

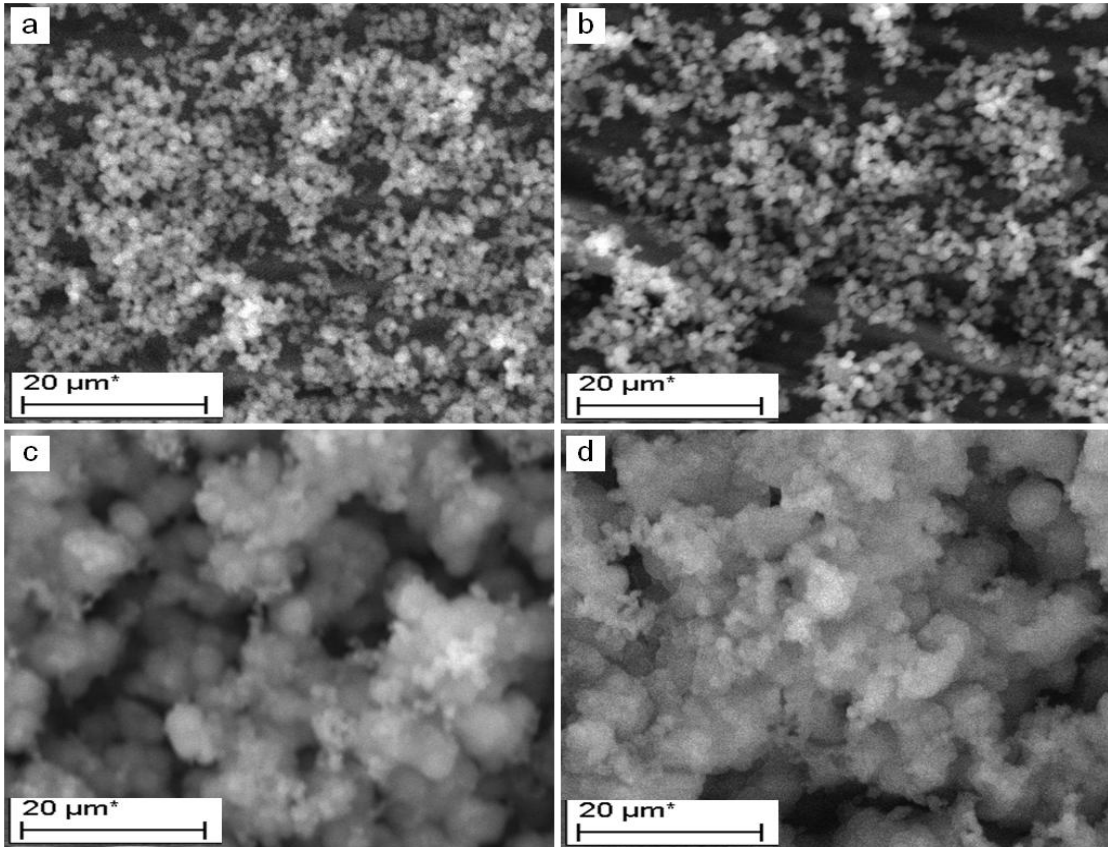
*Ti plakalar 280/400 numara zımpara ile zımparalanmış, asitle belirlenen sürelerde muamele edilmiş ve NaOH-HCl uygulamaları yapılmıştır.

Tüm bu ön uygulamalar sonucunda, yüzeyde oluşturulan nano-boyutlu pürüzlülükler, çalışmanın ilerleyen basamaklarında üretilecek olan nano-fiberlere yüzey alanı oluşturacak, fiberler, metal yüzey ve oksit tabaka üzerindeki çatlak ve porlara penetre olarak mekanik bir bağlanma sağlayacaktır. Tüm yüzey karakterizasyon sonuçları karşılaştırıldığında 5 dk asitle aşındırma uygulanan grupların, hem zımpara etkisiyle mikron boyutta, hem de ön uygulamalar sayesinde nano boyutta yüzey topografisine sahip olduğu ve böylelikle nano fiber kaplamalar için uygun bir yüzey oluşturacağı düşünülmektedir hücre kültür çalışmalarında bu gurunun kullanılması karar verilmiştir.

4.1.5. Ti malzeme yüzeyinde HA oluşumu

İmplant olarak kullanılacak malzemeler vücut içerisine yerleştirildiğinde yüzeyinde kemik yapısına benzer apatit oluşmaktadır ve malzemenin kemik ile bağlanma kapasitesini göstermektedir. Bu nedenle malzemelerin in vivo kemik biyoaktivitelerini belirlemek amacıyla Kokubo ve ark. İnsan kan plazması iyon derişimiyle aynı olan SBF çözeltilerini geliştirmiştir [130]. Günümüzde SBF çözeltileri biyoaktiviteyi arttırmak amacıyla malzeme yüzeylerinin kaplanmasında da kullanılmaktadır [98, 120, 131].

Tez çalışması kapsamında apatit çekirdeklenmelerin çok daha kısa sürelerde oluşturulması amacıyla SBF'nin 10 katı iyon derişimine sahip olan 10xSBF kullanılmıştır. Partikül oluşum sürelerinin incelenmesi ve biyoaktivitelerinin belirlenmesi için ön işlemler uygulanmış olan Ti plakalar, 10XSBF içersine daldırılarak, 18 ve 24 saatlik sürelerde, plakalar üzerinde apatit çökmesi gerçekleştirilmiştir ve SEM analizleriyle oluşan apatitlerin morfolojileri incelenmiştir. Şekil 4.2.'de bulunan SEM görüntülerinde, 18 sa çökeltme işleminden sonra malzeme yüzeyinin HA ile kaplandığı ve apatitik kalsiyum fosfat yapısına özgü karnabahar görüntüsünün oluştuğu gözlenmiştir. On sekiz saat ve 24 sa'lik çöktürme yapılan örnekler arasında morfolojik olarak fark gözlenmemektedir. Yapılan analiz sonucunda 18 sa süre içerisinde, 10XSBF ile başarılı bir şekilde Ca/P kristallerinin oluşturulduğu gözlenmiştir. Bunun üzerine, çökelmelerin taze SBF'den 18 sa'lik periyotlarla tekrarlanmasına karar verilmiş ve böylelikle apatit yapılarının büyüdüğü ve kaplama kalınlığının arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Ön işlem uygulanmış ve yüzeyi SBF ile HA kaplanmış Ti plaka SEM görüntüleri, a)18 sa HA kaplama, 2,000X, b) 24 sa HA kaplama, 2,000X, c) 2x18 sa HA kaplama, 2,000X, d) 3x18 sa HA kaplama, 2,000X.

4.2. Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Partiküllerin Üretilmesi

Tez çalışması kapsamında Ti malzeme yüzeylerine yapılacak olan kaplamaların osseointegrasyonu sağlayabilmesi için farklı özelliklerde HA partiküller kullanılmıştır. Ti yüzeyler üzerine antibakteriyel bariyer olarak kaplanacak PEO fiberlerin osteojenik etkilerinin artırılması, biyomimetik yöntemle üretilmiş HA partiküllerin katkısıyla sağlanmıştır.

Biyomimetik üretim yöntemi sayesinde, Ca/P oranı kemiğe daha yakın olan ve sitokiyometrik bileşimde olmayan HA partikülleri üretilmektedir. Bu yöntemde, insan kan plazması inorganik bileşimini taklit eden ve fizyolojik sıcaklık ve pH'da kendiliğinden apatit yapısında, Ca/P kristallerinin oluşmasına olanak sağlayan yapay vücut sıvıları (SBF) kullanılmaktadır [132]. Çalışma kapsamında HA partiküller Maviş ve ark. [98] üretilen, insan vücut sıvısı iyon derişiminin 10 katına sahip olan 10XSBF çözeltisi kullanılarak, 3 farklı yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. Bunlar; i) Oda sıcaklığında çöktürme, ii) Mikrodalga ile çöktürme, iii) Mikrodalga ile bor katkılandırma. 10XSBF literatürde kullanılan diğer SBF çözeltileri ile karşılaştırıldığında daha yüksek doygunluk seviyesine sahip olduğunu için, Ca/P çekirdeklenmelerinin çok daha hızlı olmasına olanak sağlar. Ayrıca üretim sırasında, diğer SBF çözeltilerinde kullanılan Tris ve HEPES gibi normalde kan plazmasında bulunmayan, organik tamponların kullanılmasına gerek duyulmamaktadır. SBF çözeltilerinde bu tamponların kullanılmaması farklı bozunma oranlarına sahip kalsiyum fosfat üretimine de olanak sağlamaktadır [100].

4.2.1. Oda Sıcaklığında Biyomimetik Yöntem ile Hidroksiapatit Partiküllerin (O-HA) Üretilmesi

Kemik mineralleri, mükemmel oranlı sitokiyometrik HA'e göre mono- ve divalent-kasyonlar içeren kusurlu bir yapıya sahiptir. Kemik minerallerinin sahip olduğu bu kusurlu kimya, biyo-bozunur özelliğinin artmasını sağlamaktadır. Yapay vücut sıvısından çöktürülerek hazırlanan HA'ler kemik benzeri mineral yapısına sahiptir [133].

Çalışmanın bu kısmında Maviş ve ark hazırladığı [98] 10XSBF içerisinde, uygun pH'da ve oda sıcaklığında, ekstra enerji uygulanmadan, kendiliğinden Ca/P çekirdeklenmelerinin gerçekleşmesi sağlanmıştır. Bölüm 4.15'de yapılan

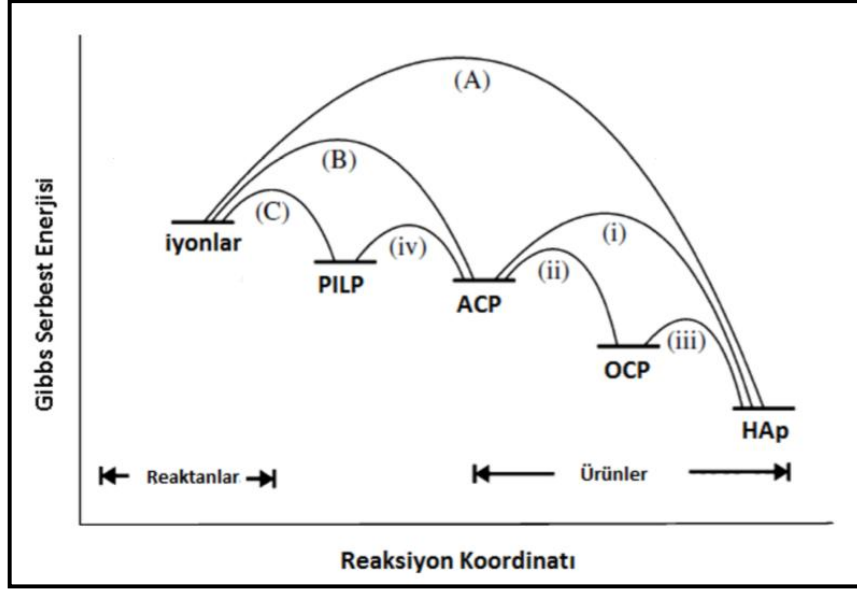
incelemeler sonucunda kaplama malzemesine katılmak üzere hazırlanan HA partiküllerin 18 sa'lik çöktürme süreleriyle hazırlanmasına karar verilmiştir.

Beşkardeş ve Gümüşderelioğlu [134], 10XSBF kullanarak PCL iskele yüzeylerine Ca/P kaplaması yapmışlar ve SEM, XRD incelemeleri ile oluşan Ca/P morfolojilerini incelemiştir. SEM görüntüleri, malzeme yüzeyinde, 6 sa'lik kaplama süresinde kalsiyum fosfat çekirdeklenme noktalarının oluştuğunu ve 24 saatlik kaplama süresinde apatitik kalsiyum fosfat yapısına özgü karnabahar benzeri morfolojinin oluştuğunu göstermiştir. XRD analizlerinde ise apatitik kalsiyum fosfat için karakteristik olan pikler görülmüştür.

4.2.2 Mikrodalga Destekli Biyomimetik Yöntemle Hidroksiapatit Partiküllerin Üretilmesi

Bu basamakta, 10XSBF çözeltilerine 30 s süresince, 9 kez, 600W mikrodalga enerjisi uygulanarak, HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, oda sıcaklığındaki çökelmeler ile karşılaştırıldığında, saniyeler bazında, çok kısa sürede, yüksek verim ve saflıkta, amorf yapıda apatit çökmesi gerçekleştirilmiştir [99].

Yarı kararlı bir çözelti olan SBF çözeltisi içerisinde bulunan iyonlar sistemin enerjisini düşürmek amacıyla, eksik kalsiyumlu HA (CDHA-dahlit), amorf kalsiyum fosfat (ACP), oktokalsiyum fosfat (OCP), dikalsiyum fosfat dihidrat (DCPD) ve dikalsiyum fosfat anhidroz (DCPA) gibi daha düşük enerjili ve termodinamik açıdan daha kararlı olan Ca/P fazlarını oluşturur. HA, termodinamik açıdan en kararlı olan fazdır ve ACP ve DCPA, HA öncülleri olarak kabul edilmektedir. Şekil 4.3'de SBF çözeltisi içerisinde sistemin izleyeceği yolların şematize edildiği grafik bulunmaktadır. Sisteme yeterli enerji verilmediği zaman SBF içerisinde bulunan iyonlar kristalizasyonla önce B-ii sonra B-iii yollarını izleyerek veya doğrudan B-i yolunu izleyerek HA oluşumunu sağlarlar[98]. SBF çözeltisine mikrodalga enerjisi uygulanması, ara fazlara uğramadan düşük enerji seviyesine sahip olan (Şekil 4.3.A) HA oluşumunu sağlamaktadır(Şekil 4.3) [135].



Şekil 4.3. Gibbs enerji seviyesinin düşmesiyle oluşan Ca/P fazları ve oluşum yolları [135].

Doğal kemik ağırlıkça, %34.8 oranında kalsiyum, %15.2 oranında fosfat iyonu içermektedir ve doğal HA'nın, Ca/P molar oranı yaklaşık 1.71 dir. Sitokiyometrik HA ise %39.6 oranında kalsiyum, %18.5 oranında fosfat iyonu içerir ve Ca/P oranı yaklaşık olarak 1.67'dir. Ca/P oranı HA'nın homojenliğini ve çözünürlüğünü büyük ölçüde etkilemektedir. Yapılan çalışmalar biyolojik HA'lar ve biyomimetik yöntemle üretilen HA'ların, sitokiyometrik HA'lara göre biyouyumluluklarının daha yüksek olduğunu göstermiştir [136].

Tez çalışması kapsamında, daha önce laboratuvarımızda belirlenen mikrodalga koşulları kullanılarak, SBF içerisinde biyomimetik yöntemle, kemik apatit yapısına benzer, ağırlıkça %9.22 karbon içeriğine sahip (karbonatlanmış HA yapısında), Ca/P oranı 1.61 olan ve B tipi HA yapısına sahip partikül çökmesi gerçekleştirilmektedir [99]. Mikrodalga enerjisinin uygulanması çözelti içerisinde enerji transferini sağlayarak reaksiyon süresini önemli miktarda kısaltmıştır ve oda sıcaklığında üretime göre çok daha kısa sürede HA partiküller hazırlanmıştır.

4.2.3. Mikrodalga Destekli Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Hidroksiapatit Partiküllerin (B-HA) Üretilmesi

Yapılan pek çok çalışma borun kemik metabolizmasında rol oynadığı, osteoindüktif etkiye sahip olduğu ve osteojenik farklılaşmayı desteklediğini göstermektedir. Kemik oluşumundaki bu rolü sayesinde bor, osteokondüktif olan

HA yapısına katılarak kemik doku mühendisliğinde kullanılabilir. Çeşitli üretim yöntemleriyle bor katkılı-HA üretimi gerçekleştirilmektedir [116, 117, 137]. Bu çalışmada mikrodalga desteğiyle olan Bor katkılı-HA (B-HA) partiküller grubumuzca daha önce yapılan çalışmalar [9] temel alınarak üretilmiş ve Ti plakaların yüzey kaplamasında osseointegrasyonu destekleyecek malzeme olarak kullanılmıştır.

Biyomimetik yöntemle B-HA üretilmesi için SBF çözeltisi içerisine, iyon değişimini değiştirmeyecek oranda borik asit eklenerek, hazırlanan B-SBF üzerine mikrodalga enerjisi uygulanmış ve B-HA partikül üretimi gerçekleştirilmiştir. Bor HA yapısına BO_3^{3-} olarak OH^- ya da PO_4^{3-} iyonları ile yer değiştirerek katılmaktadır. Ayrıca BO_2^- olarak apatitik yapıdaki kanallara, B^{3+} iyonu şeklinde Ca^{2+} ile yer değiştirerek de HA yapısına katılmaktadır. Mikrodalga enerjisi uygulanarak B-10XSBF'den, Ca/P oranı 1.40 olan ve bor içeriği ağırlıkça % 1.15 olan, çubuk morfolojisinde, B-HA partikül üretimi gerçekleştirilmiştir [9].

4.3 Titanyum İmplant Malzemelerinin HA/PEO Nano Fiberlerle Kaplanması ve Karakterizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında elektroçirme yöntemiyle üretilmiş olan PEO fiberler ile Ti plaka yüzeyleri kaplanmıştır. Elektroçirme, sistem kurulumunun ve çalışma koşullarının kolay uygulanabilir olması sebebiyle tercih edilen bir fiber üretim yöntemidir ve ihtiyaç duyulan yapısal ve mekanik özelliklere göre malzeme üretimine olanak sağlar [138].

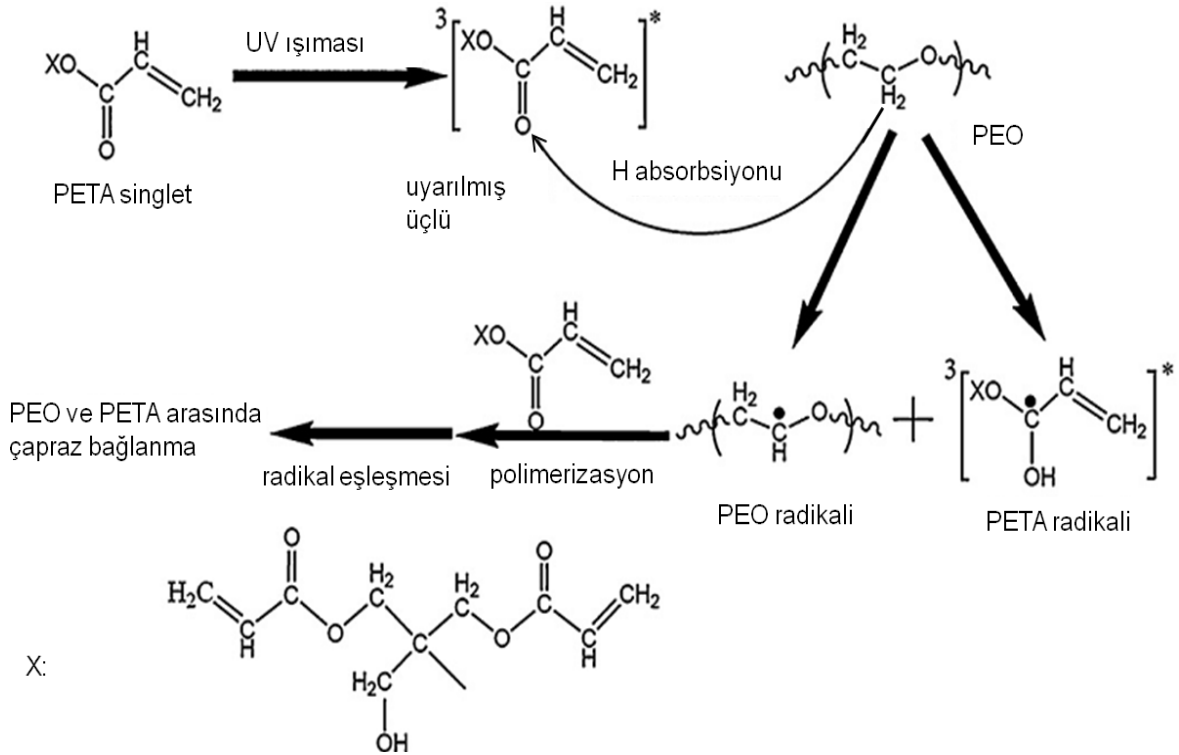
Osseointegrasyonu arttırmak amacıyla, Ti implant yüzeylerine, HA kaplamalar çeşitli yöntemlerle uygulanmakta, ancak günümüzde kullanılan yaklaşımların bazı dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle kaplama işlemlerinde kullanılan yüksek sıcaklıklar, HA yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Öte yandan kaplama kalınlığının kontrol edilemediği yöntemlerde, kalın ve kararlılığı düşük olan kaplamalar üretilmektedir. Mekanik açıdan dayanıksız implant yüzey kaplamaları, vücut içerisinde yüzeyden koparak implant başarısını düşürmektedir [74].

Tez çalışması kapsamında, PEO fiberlerin içerisine HA partiküller eklenerek, herhangi bir ısıl işlem kullanmadan, Ti plaka yüzeylerinde homojen ve kompozit yapıda HA/PEO tabakaların oluşturulması amaçlanmıştır. PEO/HA karışımları malzeme yüzeyine elektroçirme yöntemiyle homojen bir şekilde yayılarak, kemik

öncülü hücreleri tutunup bağlanmasını sağlayacak biyoaktif bölgeler oluşturan ve osseointegrasyonu destekleyen yüzey kaplamaları üretilmiştir.

Elektroçizme işleminde kullanılacak çözücü türü ve dielektrik katsayısı üretilecek olan fiber özellikleri açısından büyük öneme sahiptir. Dielektrik katsayısı, çözücü polaritesini belirleyen bir ölçüttür. Elektroçizme işlemi sırasında, dielektrik katsayısı yüksek olan çözücüler ile taşınan yükler fazla olduğu için, jete yüksek gerilme kuvveti uygulanır ve daha küçük çapta, daha az miktarda boncuk içeren fiber üretimine olanak sağlar [139]. PEO, yüksek hidrofilik yapısı sayesinde distile suda rahatlıkla çözünmektedir ve bu nedenle elektroçizme işleminde çözücü olarak, yüksek dielektrik kat sayısına sahip olan distile su kullanılmıştır. Suyun kullanılması diğer organik çözücülerin hücre çalışmalarında oluşturduğu toksik etkileri azaltacağı için büyük öneme sahiptir.

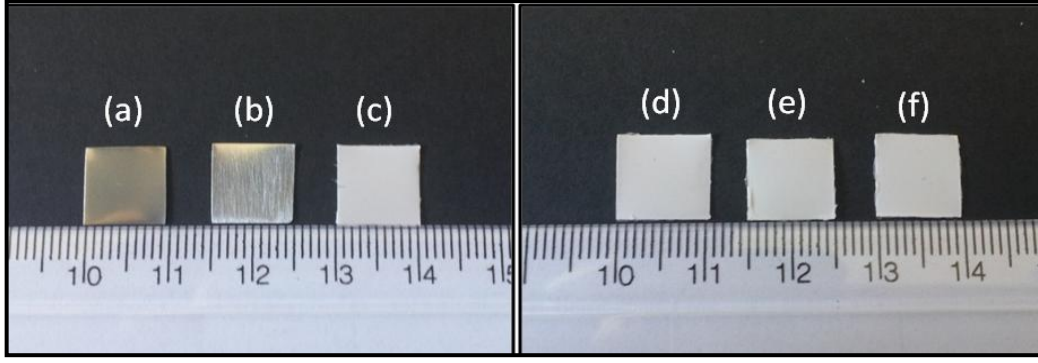
Üretilen PEO fiber kaplamalarında, foto-çapraz bağlayıcı olan pentaeritritol triakrilat (PETA) kullanılmıştır ve fiberler, 366 nm dalga boyunda ışığa yapan 12 Watt'lık ışık kaynağı ile muamele edilerek çapraz bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.4. PEO'in foto-çapraz bağlayıcı PETA ile çapraz bağlanması [140].

Şimşek ve Gümüşderelioğlu [79], fiber yapısında PEO'nun, PETA ile çapraz bağlanma koşullarını belirlemiş ve yapısal karakterizasyonlar sonucunda uygun polimer ve çapraz bağlayıcı oranlarını saptamışlardır. Çalışma kapsamında da aynı değerler (polimer, PETA oranı, süre v.b.) kullanılarak çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4'te PEO ve PETA çapraz bağlanma reaksiyonu şematize edilmiştir. PETA foto-çapraz bağlayıcısı, UV ile uyarılarak, PEO'dan bir proton (H^+) koparır ve C=O bağları açılır. PETA'nın, PEO'ya yaptığı atak ile birlikte ortamda PETA ve PEO radikalleri oluşur. Daha sonra PEO ve PETA arasında çapraz bağlama reaksiyonları gerçekleşerek, fiberler suda çözünmeyen hale gelir. Öte yandan çapraz bağlama işlemi, UV uyarısı olmadanda kendiliğinden gerçekleşebilmektedir [79].

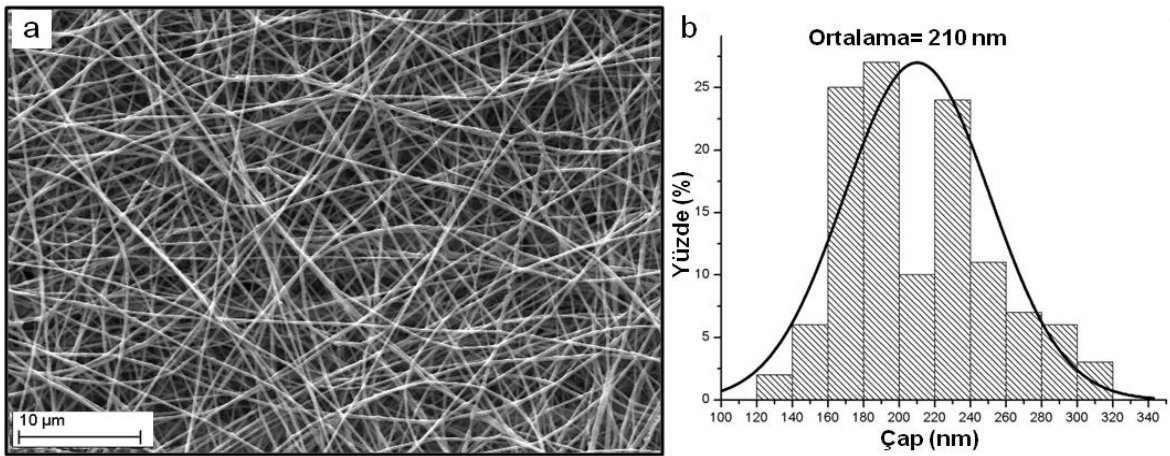
Elektroegirme uygulaması için, içerisinde farklı oranlarda B-HA, M-HA, O-HA partiküller ve PETA içeren PEO çözeltisi hazırlanmıştır. Ön uygulamaları yapılmış olan Ti plakaların yüzeyleri Bölüm 3.4'te anlatılan çalışma parametreleri kullanılarak 15 dk boyunca kaplanmıştır. Şekil 4.5.'da gösterilen Ti plakaların yüzeylerindeki HA-PEO fiberler, 8 gün süreyle kurutulduktan sonra çapraz bağlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Polimer yapısına eklenen HA partikül miktarının belirlenmesi için ağırlıkça %1, %2, %3, %4, %5, %10, %15 ve %20 oranında HA içeren çözeltiler hazırlanmış ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar tüm oranlarda HA'in, PEO fiber yapısına katıldığını ve fiber morfolojisini belirgin bir şekilde değiştirmedğini ayrıca çapraz bağlanmaların başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Analiz sonuçları devam eden bölümlerde sunulmuş ve tartışılmıştır.



Şekil 4.5. PEO fiberlerle yüzeyleri kaplanmış olan Ti plakalar a) Yüzey uygulamaları yapılmamış Ti, b) Ön işlemler uygulanmış Ti, c) PEO fiberlerle kaplanmış Ti, d) Mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti (M-HA/PEO/Ti), e) Bor katkılı HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti (B-HA/PEO/Ti), f) Oda sıcaklığında üretilmiş HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış Ti (O-HA/PEO/Ti).

4.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

HA-PEO fiberlerin morfolojileri, HA yerleşimleri ve yapılarının incelenmesi için SEM analizleri yapılmıştır. Şekil 4.6. a ve b'de sırasıyla HA içermeyen PEO fiberlerin SEM fotoğrafı ve Image J programı kullanılarak hesaplanan çap dağılım grafiği verilmiştir. Görüntüler, boncuk içermeyen homojen çap dağılımına sahip fiberlerin oluştuğunu göstermektedir. PEO fiberlerin çaplarının ortalama 210 ± 41 nm olduğu hesaplanmıştır. Şimşek ve Gümüşderelioğlu [79], %4 (w/v) oranında PEO ve %10 (w/w) oranında PETA içeren fiberlerinin çaplarının 184 ± 48 nm olduğunu gözlemlemişlerdir.

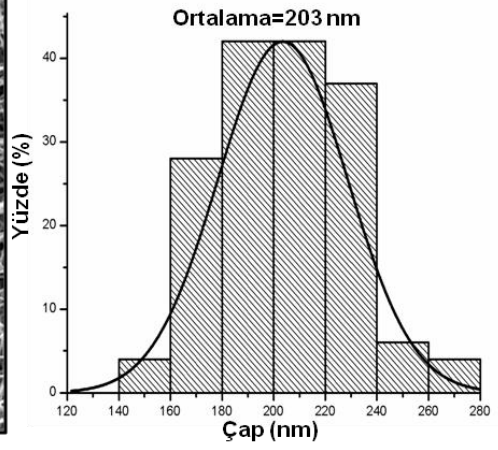
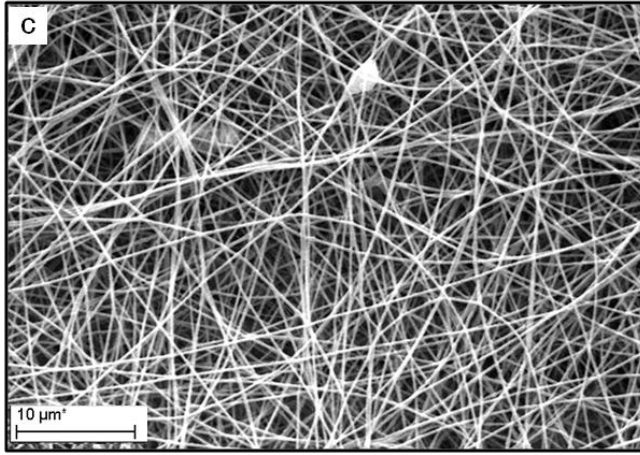
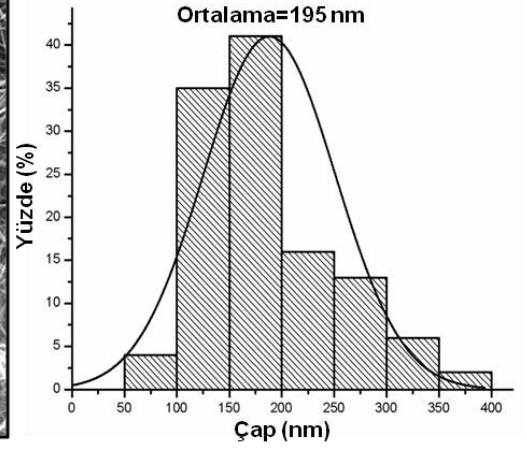
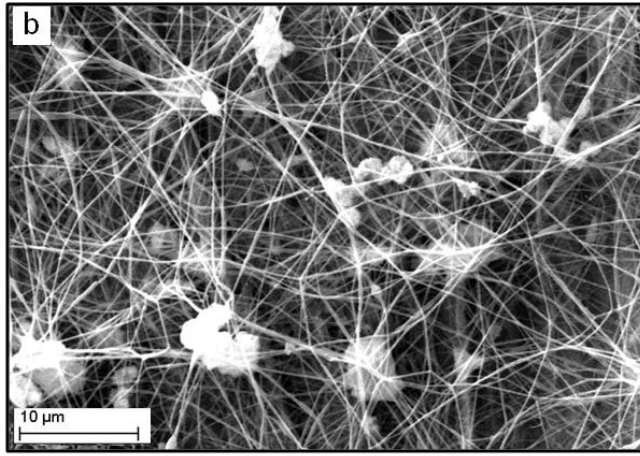
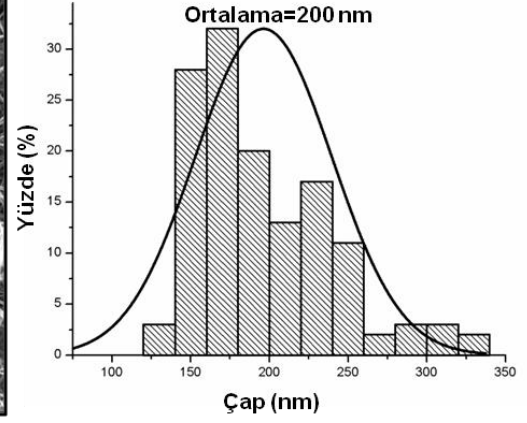
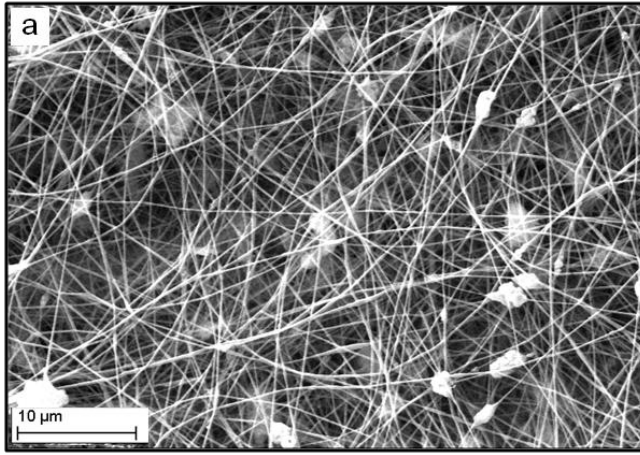


Şekil 4.6. Ti yüzey üzerine kaplanmış PEO fiberlerin, a) SEM görüntüsü, (5,000x), b) Çap dağılım grafiği.

Şekil 4.7’de HA içeren çapraz bağlı PEO fiberlerinin SEM fotoğrafları verilmiştir. O-HA içeren fiberler, B-HA ve M-HA içeren fiberler ile karşılaştırıldığında, O-HA partiküllerin PEO fiberlerin içerisinde dağıldığı ve fiber yüzeyinde kümelenmelerin bulunmadığı gözlenmektedir (Şekil 4.7.c). M-HA partiküllerin ise büyük kümeler oluşturarak fiberler üzerinde yerleştikleri gözlenmektedir. HA içeren fiberler ile içermeyen fiber çapları karşılaştırıldığında, HA katkısıyla birlikte fiber çaplarının büyük değişiklikler göstermediği gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Farklı oranlarda HA içeren, PEO fiberlerin ortalama çap değerleri.

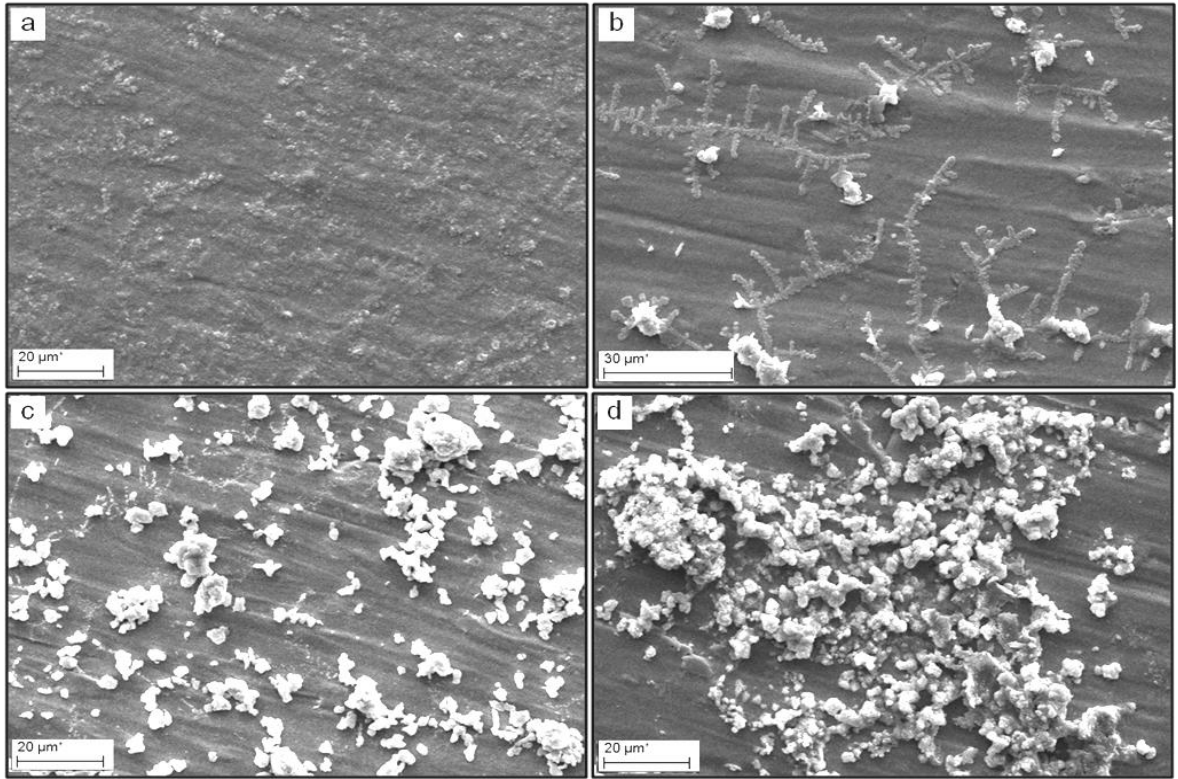
HA oranı (%)	B-HA/PEO fiber çapları (nm)	M-HA/PEO fiber çapları (nm)	O-HA/PEO fiber çapları (nm)
1	179±42	198±71	
2	202±48	184±73	
3	177±46	194±68	191±49
4	213±61	201±58	200±129
5	229±86	235±165	191±118
10	213±65	212±147	180±55
15	214±64	212±198	187±43
20	200±51	195±81	203±25



Şekil 4.7. Ti yüzeyler üzerine kaplanan, HA içeren PEO fiberlerin SEM görüntüleri ve çap dağılım grafikleri. a) %20 (w/w) oranında B-HA içeren fiberler, (5,000X), b)%20 (w/w) oranında M-HA içeren fiberler, (5,000X), c) %20 (w/w) oranında HA içeren fiberler, (5,000X).

Ti yüzeylerin hücre kültür ortamıyla etkileşimi sonrası SEM analizi

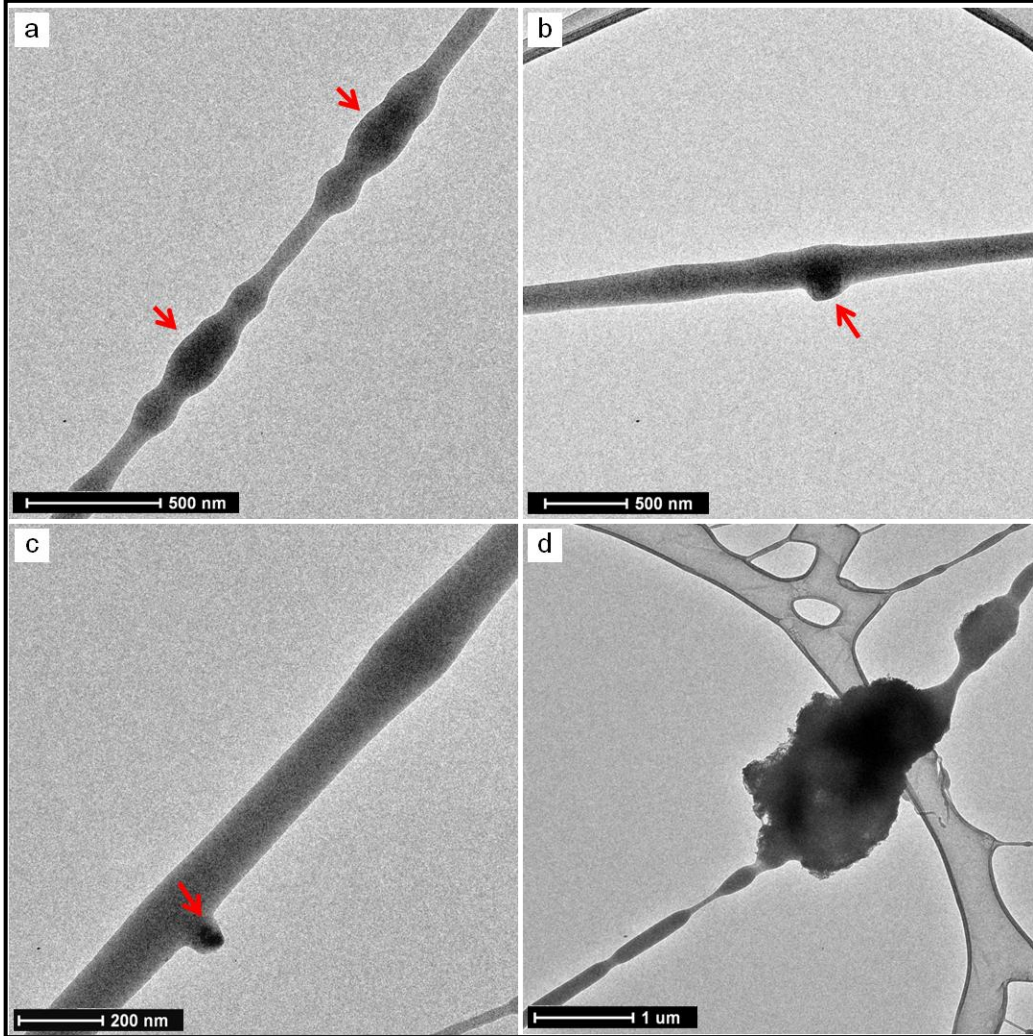
Şekil 4.8'da PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti plakaların hücre ekilmeden 3 gün hücre kültür ortamında bekletildikten sonraki fiber ve HA görüntüleri gözlenmektedir. Tüm örneklerde fiberlerin şişerek Ti yüzeyini tamamen kapladığı, HA partiküllerin ise malzeme yüzeyinde eşit bir şekilde yayıldığı gözlenmektedir. Şekil 4.8'da bulunan görüntüler, hücre kültürü ve antibakteriyel çalışmalarda hücrelerin nasıl bir yüzey üzerine tutunduğunu göstermektedir. Şekil 4.8.a 'da boş PEO fiberler tamamen yüzeyi kaplamış ve antibakteriyel özellik sağlayacak bir ara yüzey oluşturmuştur. HA içeren fiberler kendi aralarında kıyaslandığında Şekil 4.7'de bulunan SEM görüntülerine benzer olarak O-HA içeren grupların, M-HA ve B-HA içeren gruplara göre daha küçük kümeler halinde yüzeye yayıldığı gözlenmiştir. Ayrıca, O-HA içeren fiberlerle çok daha pürüzsüz bir yüzey kaplaması üretilmesine olanak sağladığı belirlenmiştir ve antibakteriyel özelliğe etkisi Bölüm 4.5.'de anlatılmıştır.



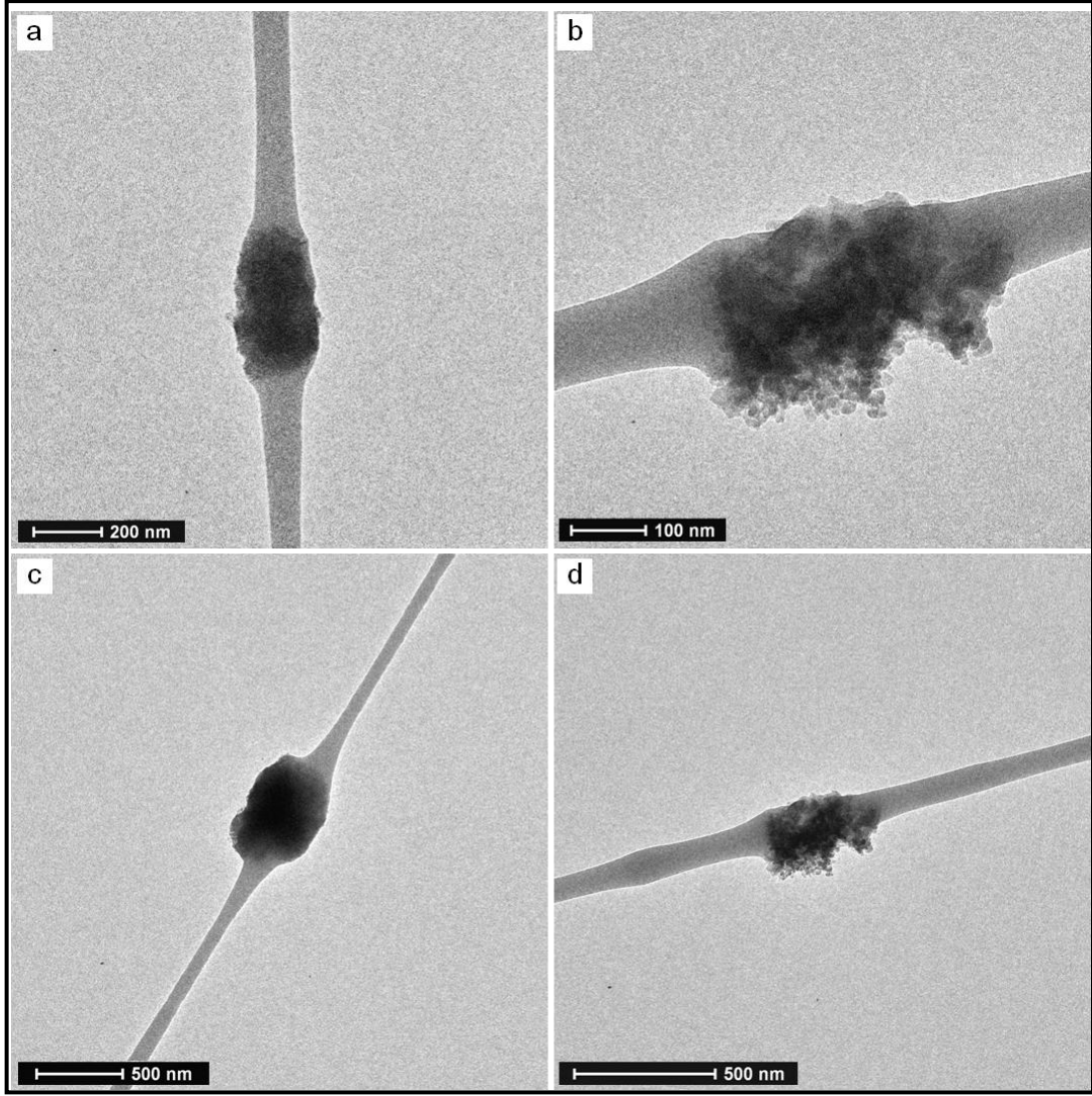
Şekil 4.8. Yüzeyi HA içeren PEO fiberlerle kaplanmış olan Ti plakaların 3 gün hücre kültür ortamı içerisinde bekletildikten sonraki SEM görüntüleri. a) PEO/Ti, 2,000X, b) O-HA/PEO/Ti, 2,000X, c) B-HA/PEO/Ti, 2,000X, c) M-HA/PEO/Ti, 2,000X.

4.3.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

HA partiküllerin fiber yapı içerisinde dağılımlarının incelenmesi için TEM analizleri yapılmış ve HA partiküllerin başarılı bir şekilde PEO yapı içerisine katıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.9, 4.10, 4.11). Şekil 4.9.a ve b ve d'de B-HA/PEO partiküller kırmızı oklarla işaretlenmiştir ve fiberlerin içerisinde konumlandıkları gözlenmektedir. Şekil 4.9.d'de ise B-HA partiküllerin kümelenmiş halde fiber yapısına katıldığı gözlenmektedir.

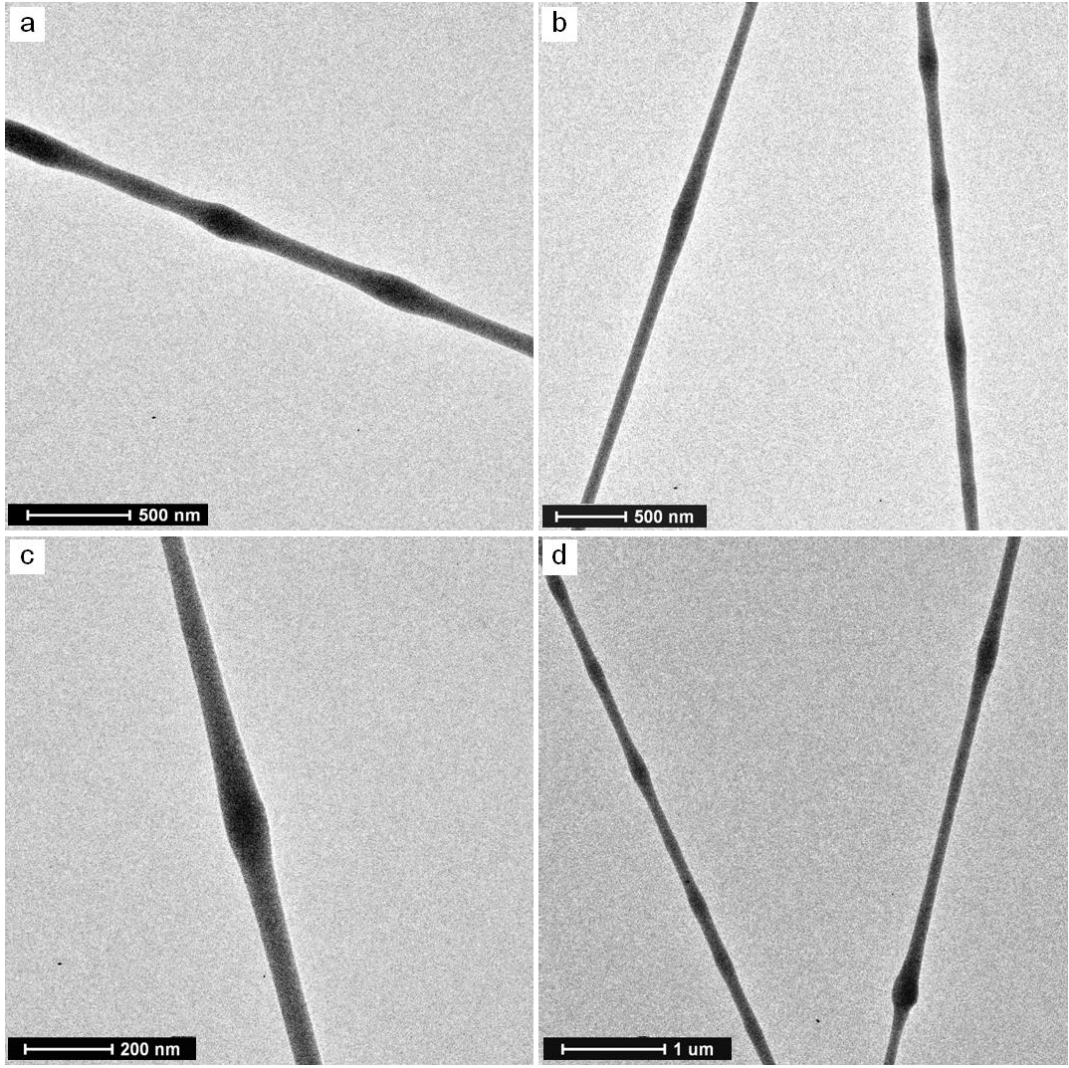


Şekil 4.9. %20 (w/w) oranında mikrodalga desteği ile üretilmiş, bor katkılı HA içeren PEO fiber (B-HA/PEO) TEM görüntüleri. Ölçek boyutları, a) 500 nm, b) 500 nm, c) 200nm, d) 1µm, kırmızı oklar fiber içerisine hapsolmuş B-HA partikülleri göstermektedir.



Şekil 4.10. %20 (w/w) oranında mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiber (M-HA/PEO) TEM görüntüleri. Ölçek boyutları, a) 200nm, b) 100nm, c) 500nm, d) 500nm.

Şekil 4.10'da M-HA/PEO fiber görüntüleri bulunmaktadır. Partiküllerin büyük kümeler oluşturduğu ve fiber morfolojilerini bozmadan fiber yapısına katıldığı fotoğraflardan açıkça gözlenmektedir. Şekil 4.11'de bulunan, O-HA/PEO fiberler ile karşılaştırıldığında, hem B-HA, hem de M-HA partiküllerin daha büyük kümeler oluşturduğu, O-HA partiküllerin ise daha küçük gruplar halinde fiber yapısına katıldığı gözlenmektedir (Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11). TEM görüntüleri Şekil 4.7'deki SEM görüntüleri ile de uyumlu olup, her 2 analizde birbirini desteklemektedir.



Şekil 4.11. %20 (w/w) oranında oda sıcaklığında üretilmiş HA içeren PEO fiber (O-HA/PEO) TEM görüntüleri. Ölçek boyutları, a) 500 nm, b) 500 nm, c) 200 nm, d) 1 μ m.

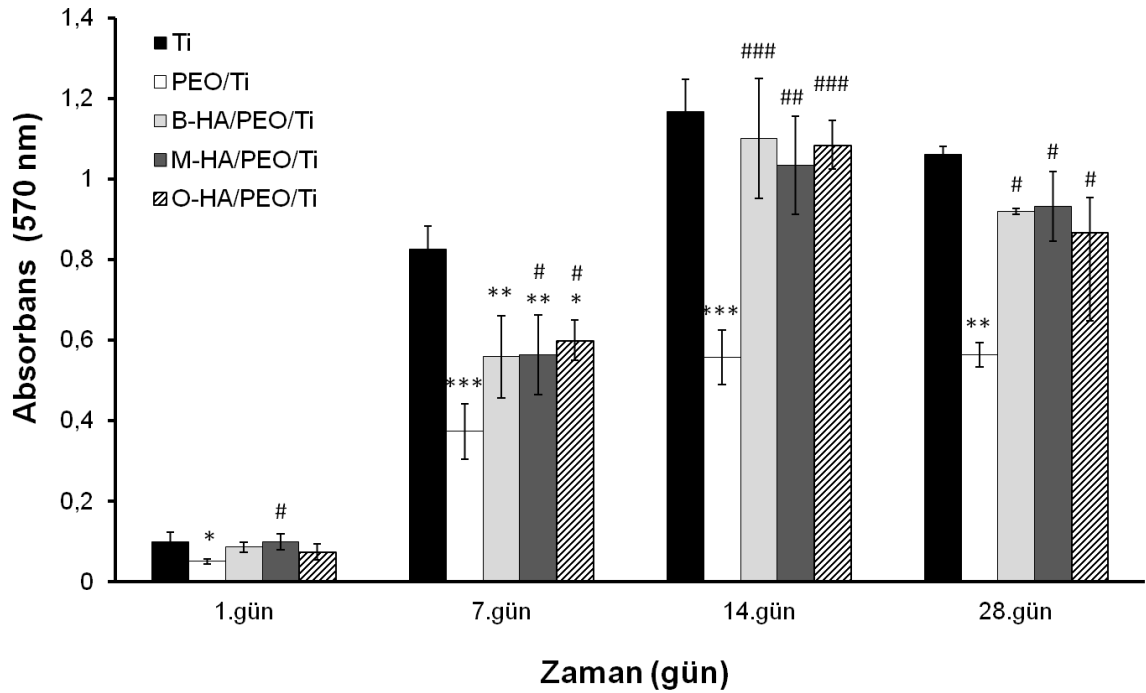
4.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmanın bu basamağında, yüzeyleri PEO fiberlerle kaplanmış olan Ti plakaların osteojenik aktivitelerinin belirlenmesi için MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri kullanılarak 28 günlük hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Hücre canlılığı kontrolü MTT testi ile hücre morfolojileri SEM analizi ile incelenmiş ve hücrelerin osteojenik farklılaşması, Bölüm 4.4.2. ve 4.4.3'de anlatılan ALP analizleri ve RT-PCR analizleriyle takip edilmiştir. Alp ve Rt-PCR analizlerinde aşağıdaki gruplar kullanılmıştır. SEM ve MTT incelemelerinde Aşağıdaki gruplara ek olarak negatif kontrol olan PEO/Ti grubu da kullanılmıştır.

- 1) Ön işlemler uygulanmamış Ti plakalar (Ti)
- 2) Ön işlemler uygulanmış ardından B-HA/PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (B-HA/PEO/Ti)
- 3) Ön işlemler uygulanmış ardından M-HA/PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (M-HA/PEO/Ti)
- 4) Ön işlemleri uygulanmış ardından O-HA/PEO fiberlerle kaplanmış Ti plakalar (O-HA/PEO/Ti)

4.4.1. MTT Analizi

Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalardaki hücre üremesi, 28 günlük inkübasyon periyodunda mitokondriyal aktivite tayin testi (MTT testi) ile incelenmiş ve Ti plakalarla yüzeyleri fiberlerle kaplanmış gruplar arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Plakaların yüzeylerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerinin 1, 7, 14 ve 28. günlerdeki MTT analiz sonuçları Şekil 4.12.'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur); # p<0.05, ## p<0.01, ### (PEO/Ti kontrol grubudur).

MTT grafiği incelendiğinde 1. günden 14. güne, hücre canlılığının tüm gruplarda arttığı, 28. güne geldiğinde hafif bir azalma gösterdiği belirlenmiştir. Sadece PEO fiber ile kaplı olan gruplarda (PEO/Ti), hücre canlılığında 1. günden 7.güne, 7 kat ($p<0.001$), 7. günden 14. güne 1.5 kat ($p<0.001$) artış gözlenmiş kùltürünün diğer günlerinde sabit kalmıştır ($p>0.05$). Kùltürün 1. gününde gruplar arasında büyük bir fark gözlenmezken, 14 ve 28.günlerde PEO/Ti' da bulunan PEO fiberlerin yüksek hidrofilik özelliğine rağmen, HA içeren; B-HA/PEO/Ti ($p<0.01$), M-HA/PEO/Ti ($p<0.01$), O-HA/PEO/Ti ($p<0.05$) gruplarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Hücre canlılığı HA içeren gruplarda 1.günden 14.güne logaritmik olarak artmış ve 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 14. gün sonuçları, PEO/Ti grubuna göre, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti gruplarında hücre canlılığının iki kat arttığını ve HA katkısının hücre yapışmasını belirgin bir şekilde desteklediğini göstermiştir.

Genel olarak MTT verileri incelediğinde, PEO/Ti grubu yüzeyinde bulunan hücre metabolik aktivitelerinin nerdeyse sabit kaldığı, HA katkısı ile hücre canlılık değerlerinde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Farklı özelliklere sahip HA grupları arasında anlamlı olan bir fark bulunmazken, tüm hidroksiapatitlerin hücre tutunmasını aynı oranda desteklediği gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada HA katkısı ile yüksek hidrofilik özellikte olan PEO fiberlerin hücre yapışmasını ve çoğalmasını destekleyen bir özelliğe ulaşması sağlanmıştır. HA ile modifiye edilen kaplamalar Ti plakalar kadar hücre tutunmasını desteklemiştir.

Literatürde de bu çalışmadaki sonuçları destekleyen bulgular yer almaktadır. şimşek ve Gümüşderelioğlu'nun [79], MC3T3-E1 hücreleri kullanarak yaptığı bir çalışmada PEO fiber ile kaplanan Ti malzemelerin hücre yapışmasına etkisi incelenmiştir. Bu alışmada, PEO ile kaplanmış yüzeylerin, kaplanmamış olan Ti yüzeylere göre hücre yapışmasını önemli derecede azalttığı belirtilmiştir.

Tosatti ve ark. [141], kumlama ve asit ile pürüzlendirilmiş (SLA-Ti) Ti yüzeylere poli-(l-lizin)-g-PEG kaplamaları yapmış ve MG63 osteoblast benzeri hücreleri kullanarak malzeme yüzeyine yapışma miktarlarını incelemişlerdir. PEG bazlı yüzey kaplamasının osteoblast benzeri hücre yapışmasını SLA-Ti yüzeylere göre ($p<0.05$) % 50 azalttığı gözlenmiştir.

Ito ve ark. [142], HA ile işlevselleştirilmiş, PEG kompozit hidrojenlerinin osteojenik aktivite değişimlerini MG63 insan osteoblast benzeri hücreleri ile yapılan kültür çalışmalarında incelemişlerdir. Kalsiyum şelatlayıcı ajanlar eklenerek farklı kristalin özelliklere sahip kompozit kalsiyum fosfat-PEG hidrojenleri üretilmişler ve 7 günlük hücre kültürü periyodunda, tüm HA katkılarının, malzeme üzerine yapışan hücre sayısını belirgin bir şekilde arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca kültürün 7. gününde daha düşük kristalin özelliğe sahip HA içeren hidrojenlerin hücre yapışmasını HA içermeyen PEG hidrojenlere göre 2.5 kat ($p < 0.05$) arttırdığı gözlenmiştir.

4.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

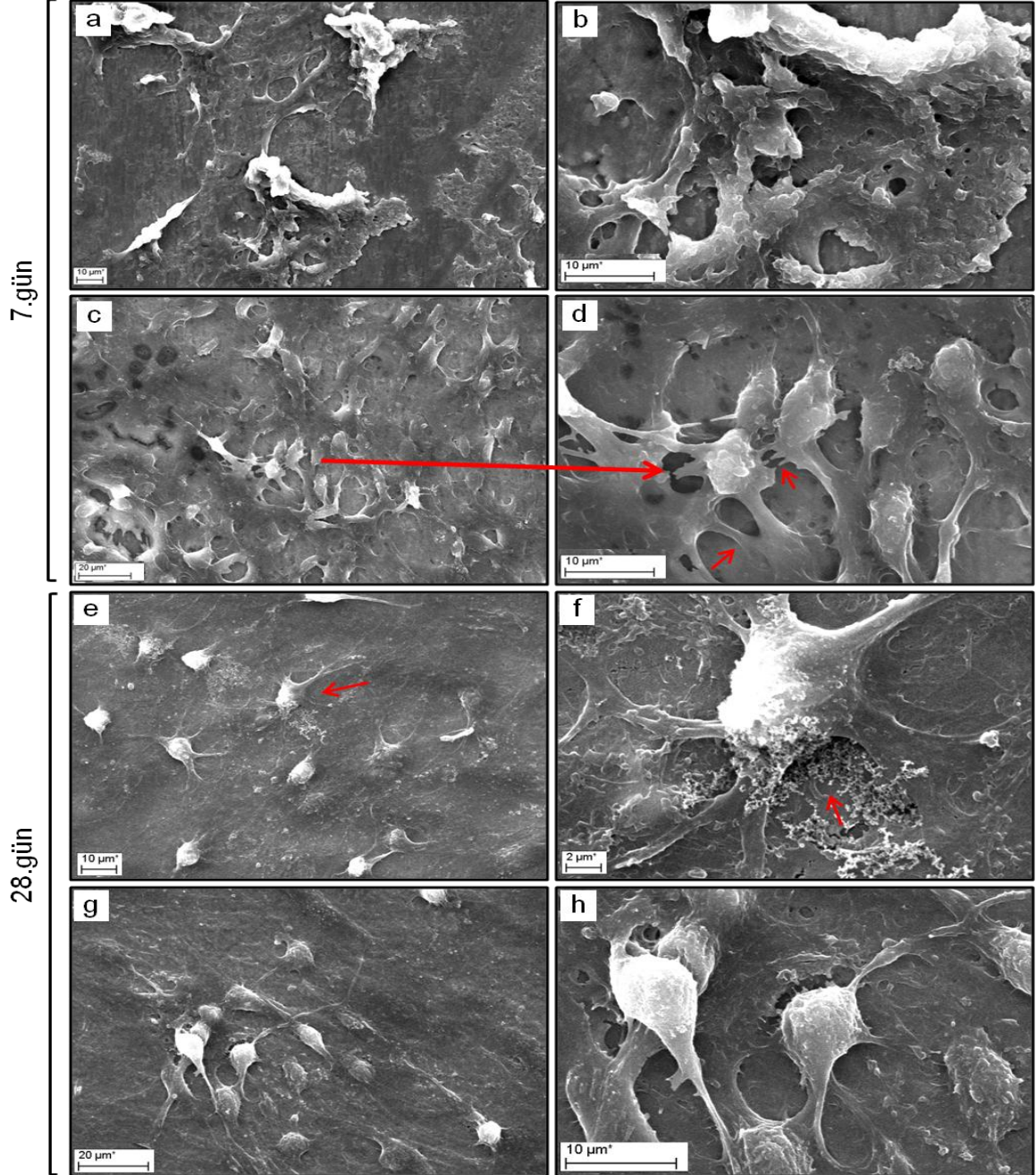
Hazırlanan Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti ve O-HA/PEO/Ti plaka yüzeylerinde bulunan MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin morfolojileri ve hücre-malzeme etkileşimleri SEM görüntüleri ile incelenmiştir.

Ti plakalar üzerindeki hücre morfolojileri Şekil 4.13'de verilmiştir. Kültürün 7. gün SEM görüntülerinde (Şekil 4.13. a, b, c ve d) hücrelerin Ti plakalara tutundukları, yayıldıkları ve yoğun hücre katmanları oluşturdukları açıkça gözlenmektedir. Şekil 4.13.d'de kırmızı oklar ile işaret edilen, hücrelerin sitoplazmik uzantıları sayesinde birbiriyle ve malzeme ile olan etkileşimleri görülmektedir. Kültürün 28.günü SEM görüntülerinde (Şekil 4.13. e, f, g ve h) hücre katmanlarının artarak plaka yüzeyini tamamen sardığı ve hücre dışı matris ürettikleri gözlenmektedir.

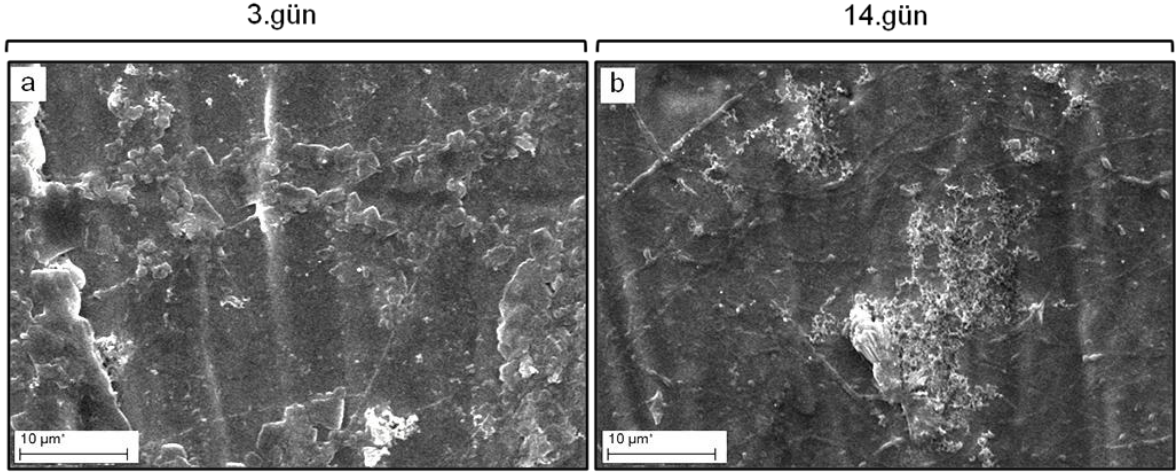
PEO/Ti plakaların yüzeyinde bulunan hücrelerin 3. ve 14. gün SEM görüntüleri Şekil 4.14'te bulunmaktadır. Bu grup örneklerinde hücre kalıntılara rastlanmıştır ancak sağlıklı bir hücre-yüzey etkileşimi olmadığı gözlenmiştir. PEO fiberlerin hidrofilik özellikleri, hücrelerin malzeme yüzeyine yapışmasını büyük ölçüde engellemiştir. Kültürün ilerleyen günlerinde diğer gruplardaki gibi yoğun hücre tabakalarına ve hücre dışı matris katmanlarına bu grupta rastlanmamıştır.

M-HA/PEO/Ti plakaların üzerindeki hücrelerin 7. gün ve 28. gün SEM görüntüleri sırasıyla, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16' de verilmiştir. Şekil 4.15.b, c ve d'de verilen 7. gün görüntülerinde hücrelerin malzeme yüzeyini kapladığı gözlenmektedir. Şekil 4.15.b ve c'de kırmızı okla gösterilen yapılar, malzemede bulunan HA partikül kümeleridir ve 7. günde hücreler bu kümeler üzerine yapılmış ve yayılmıştır. Şekil 4.15.a'da M-HA içeren çapraz bağlanmış fiberlerin hücre kültüründe kullanılmadan önceki görüntüleri bulunmaktadır ve 7. gün SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında

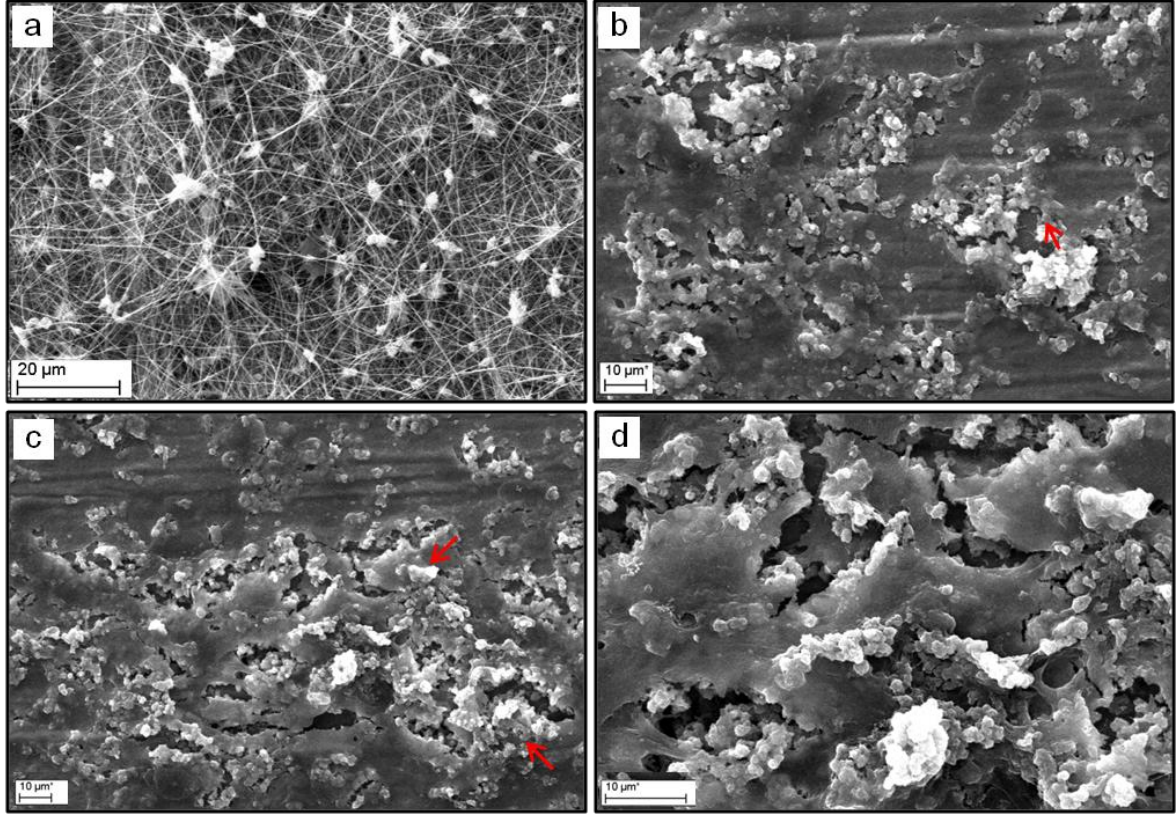
(Şekil 4.15.b, c ve d), kemik öncülü hücrelerin HA partiküllerinin kümелendiği yerlerde çoğaldığı gözlenmektedir. Kültürün 28. günündeki fotoğraflarda ise (Şekil 4.16), malzeme yüzeyindeki hücre miktarında belirgin bir artış olduğu ve hücre katmanlarının yoğun bir şekilde malzeme yüzeyini kapladığını görülmektedir.



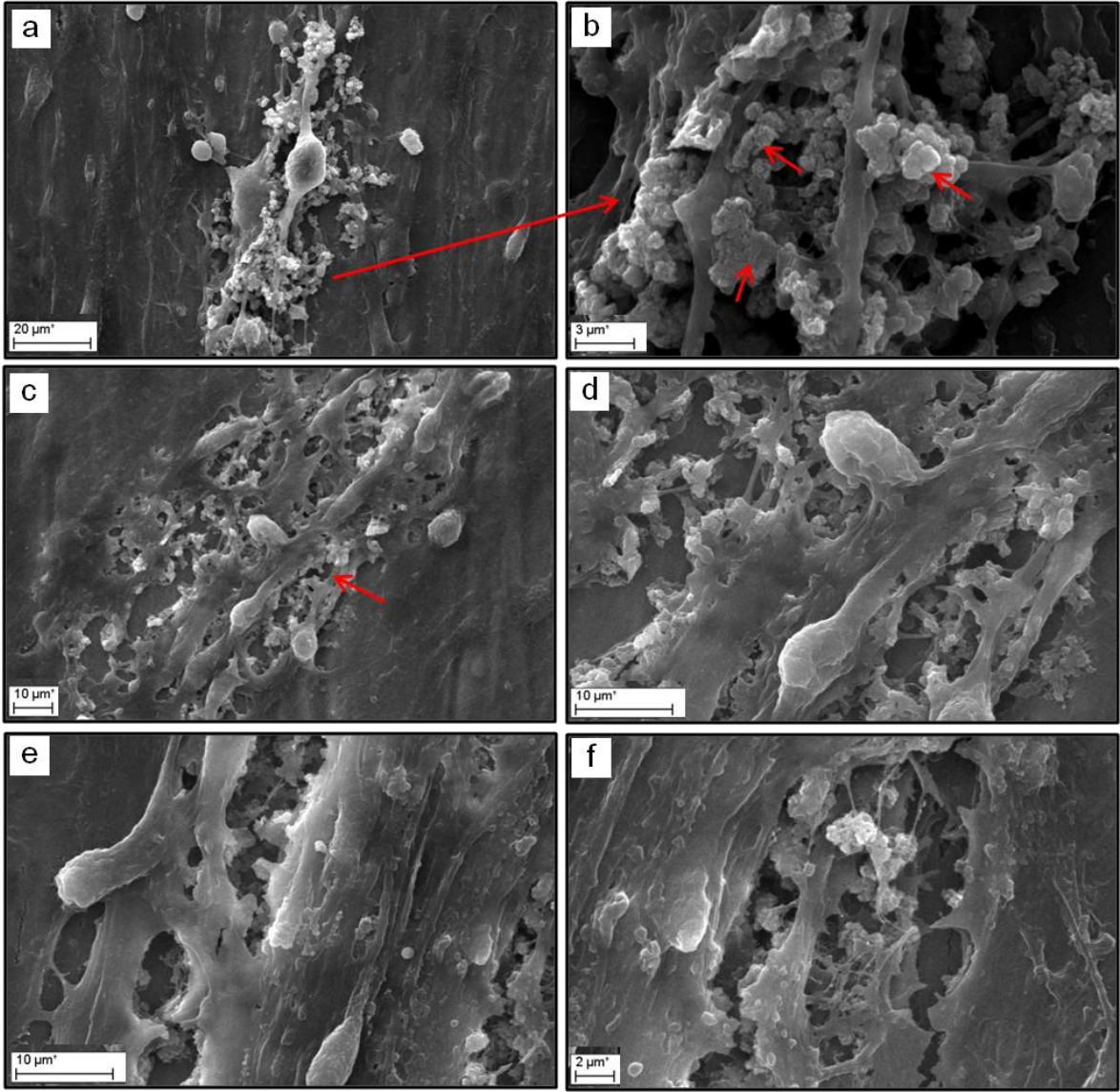
Şekil 4.13. Ti plakaların (Ti) yüzeylerinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerinin 7. gün (a,b,c,d) ve 28. gün (e,f,g,h) SEM görüntüleri. (a) 2,000X, (b) 5,000X, (c) 2,000X, (d) 5,000X, (e) 2,000X, (f) 10,000X, (g) 2,000X, (h) 5,000X. (a, e) Kırmızı oklar MC3T3 hücrelerin sitoplazmik uzantılarını göstermektedir. (f) Kırmızı ok hücre dışı matris katmanlarını işaret etmektedir.



Şekil 4.14. PEO ile kaplı Ti (PEO/Ti) plakaların üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin (a) 3. gün , (b) 14. gün SEM görüntüleri. (a, b) 5,000X.

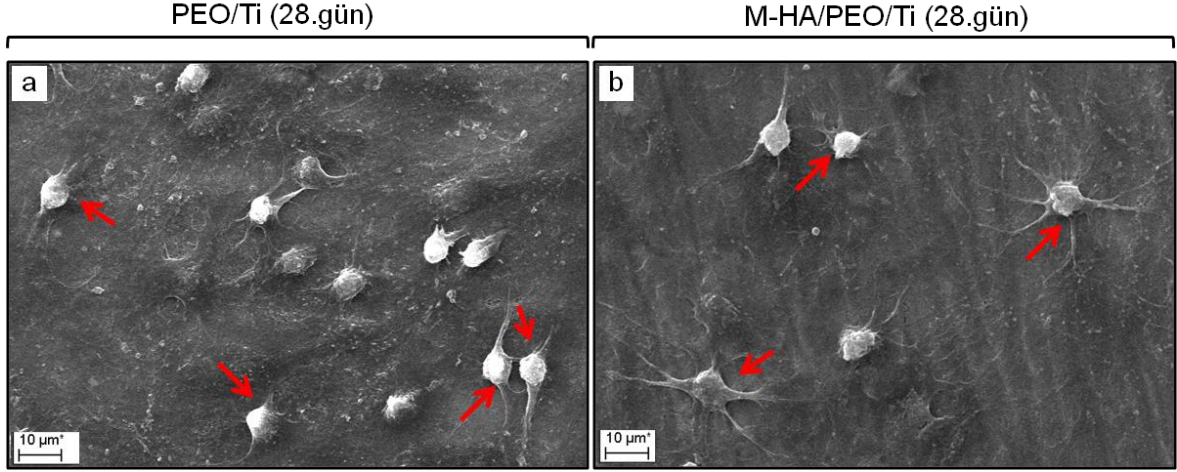


Şekil 4.15. (a) Mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiberler ile kaplanmış Ti plakaların (M-HA/PEO/Ti) SEM görüntüsü, 2,000X. (b, c ve d) (M-HA/PEO/Ti) üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin 7.gün SEM görüntüleri. (b, c) 2,000X, (d) 5000X. Kırmızı oklar M-HA partikül kümelerini işaret etmektedir.



Şekil 4.16. Mikrodalga desteği ile üretilmiş HA içeren PEO fiberler ile kaplanmış Ti plakaların (M-HA/PEO/Ti) üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin 28.gün SEM görüntüleri. (a) 2,000X, (b)10,000X, (c) 2,000X, (d) 5,000X, (e) 5,000X, (f) 10,000X.

Şekil 4.17’de, Ti ve M-HA/PEO plakaların 28. gün SEM görüntüleri karşılaştırılmıştır. M-HA/PEO/Ti plaka yüzeylerinde bulunan hücre uzantılarının Ti plakalara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Hücreler HA ile kimyasal ve fiziksel etkileşime girerek sitoplazmik uzantıları ile apatitlere doğru yönelmektedirler. Bölüm 4.4.1’de incelenen MTT değerleriyle malzeme yüzeylerindeki hücre miktar artışlarının paralel olduğu gözlenmektedir.



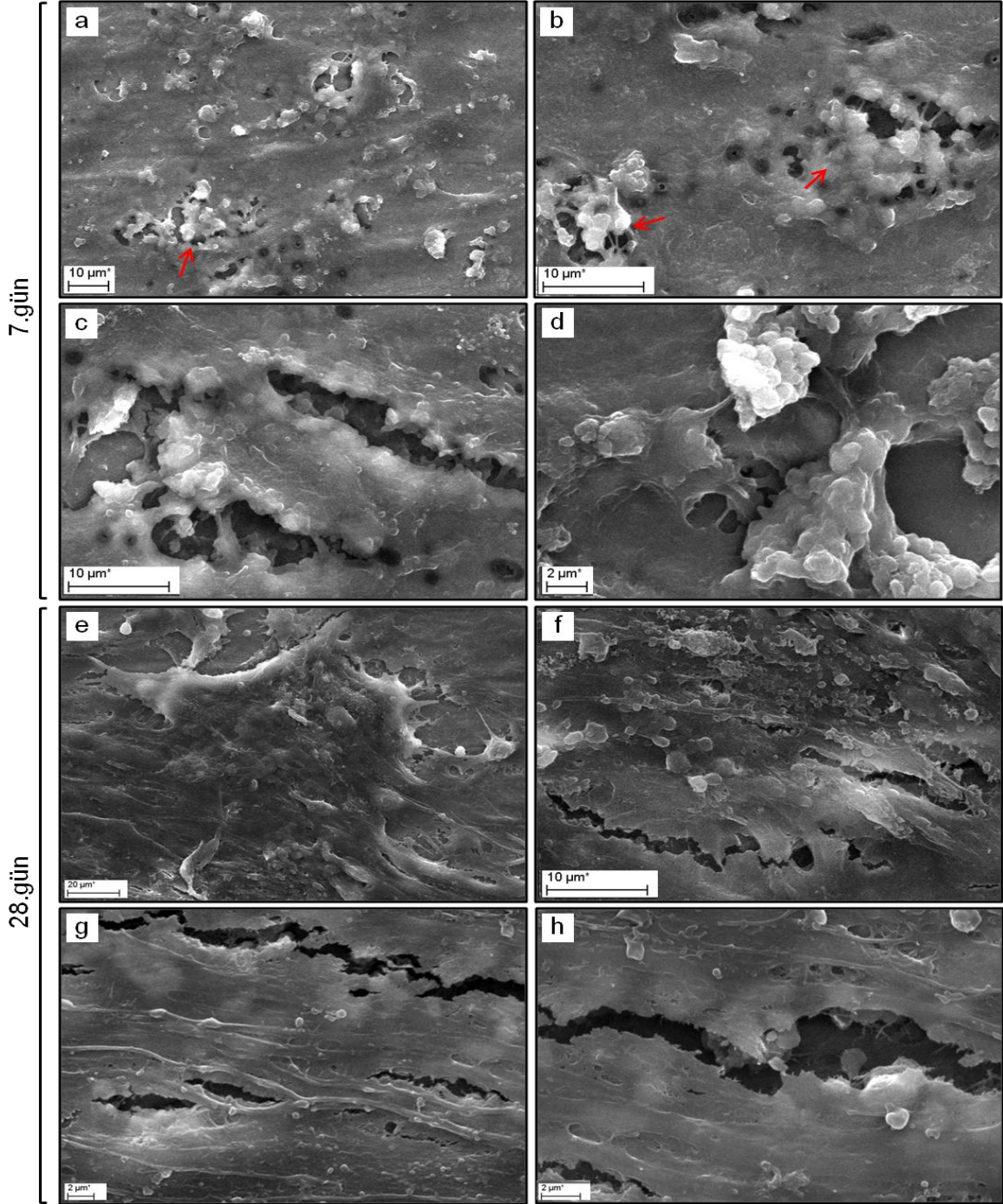
Şekil 4.17. a) Ti plakaların 28.gün hücre kültürü SEM görüntüsü, (2,000X). b) M-HA/PEO/Ti plakaların 28.gün hücre kültürü SEM görüntüsü, (2,000X).

Şekil 4.18’de bor katkılı HA (B-HA) içeren fiberler ile kaplanmış Ti plakaların (B-HA/PEO/Ti) 7 ve 28. gün hücre kültürü SEM görüntüleri bulunmaktadır. 7. gün görüntülerinde (Şekil 4.18.a, b), M-HA/PEO/Ti örneklerinde olduğu gibi hücrelerin özellikle B-HA partikül kümelerinin üzerlerini sardığı ve malzemeyi tamamen kapladığı gözlenmektedir. Kültürün 28. gününde malzeme yüzeyinde çok yoğun hücre katmanları ve hücre dışı matris oluşumu gözlenmektedir.

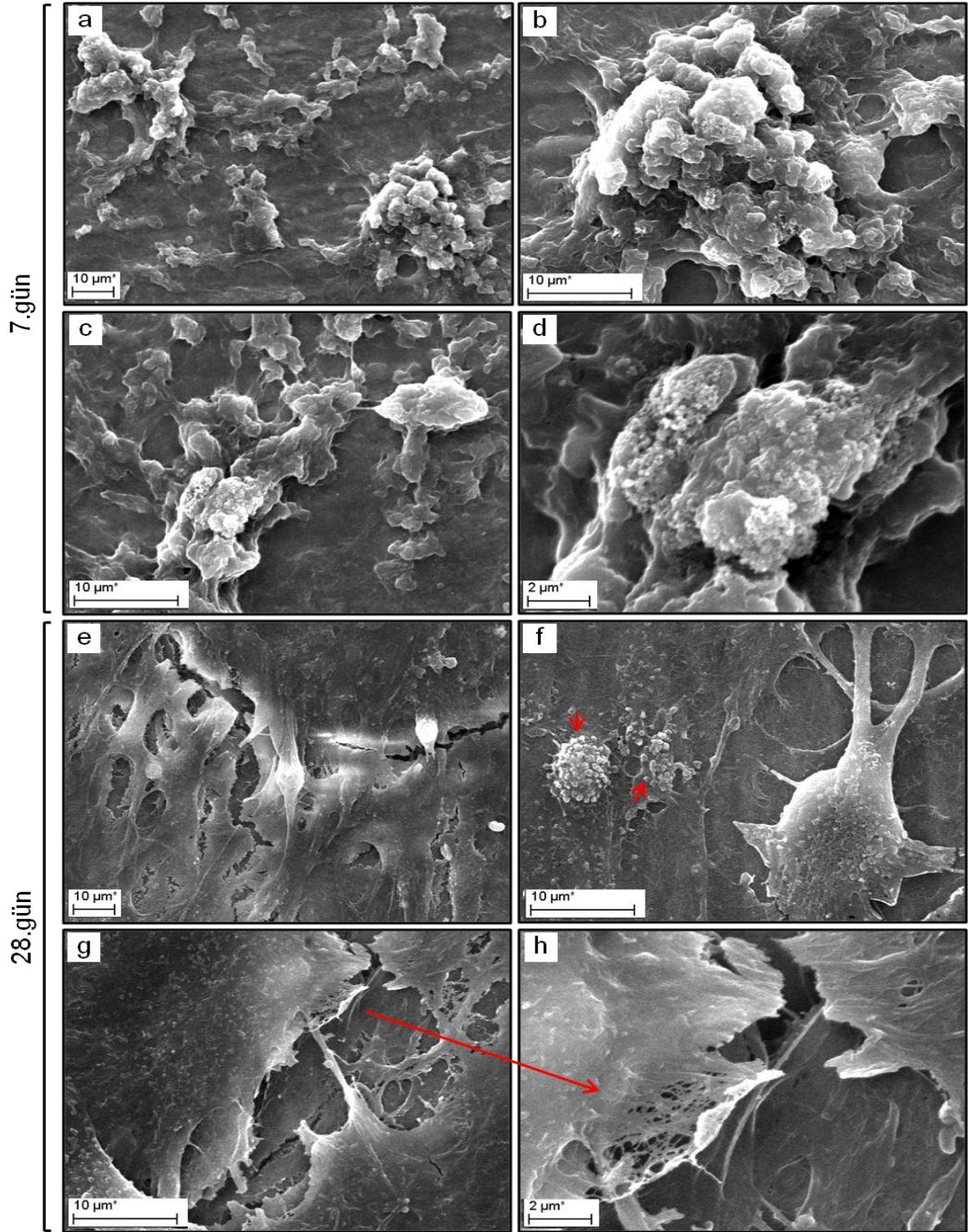
Oda sıcaklığında üretilmiş HA partiküller içeren PEO kaplamaların yüzeylerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin 7 ve 28. gün SEM görüntüleri Şekil 4.19’da bulunmaktadır. Yine 7. ve 28. gün örneklerinde hücrelerin yüzeyi tamamen kapladığı ve yoğun hücre dışı matris ürettikleri gözlenmektedir. 28 günde malzeme yüzeyinde hücre miktarının belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiş, özellikle kollajen fiber görüntüleri Şekil 4.19.h’de ve hücrelerin ürettiği mineral kümeler Şekil 4.19.f’de belirgin bir şekilde gözlenmektedir.

Bu sonuçlar, PEO fiberlere HA katkısının, MC3T3-E1 hücrelerinin tutunmasını, yayılmasını, üremesini ve osteoblastik farklılaşmasını desteklediğini göstermiştir. SEM görüntüleri MTT sonuçlarını destekleyen niteliktedir. 7. ve 28. günde MTT sonuçları (Şekil 4.12) yüksek olan HA içeren (B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti) ve Ti gruplarının SEM görüntülerinde kemik öncülü hücrelerin malzeme yüzeyini tamamen kapladığı gözlenmiştir. PEO ile kaplı yüzeylerde ise yine MTT sonuçlarını destekleyecek şekilde hücre malzeme etkileşiminin düşük

olduğu ve diğer guruplarda gözlenen hücre tabakalarının ve katmanlarının bu guruplarda bulunmadığı gözlenmiştir.



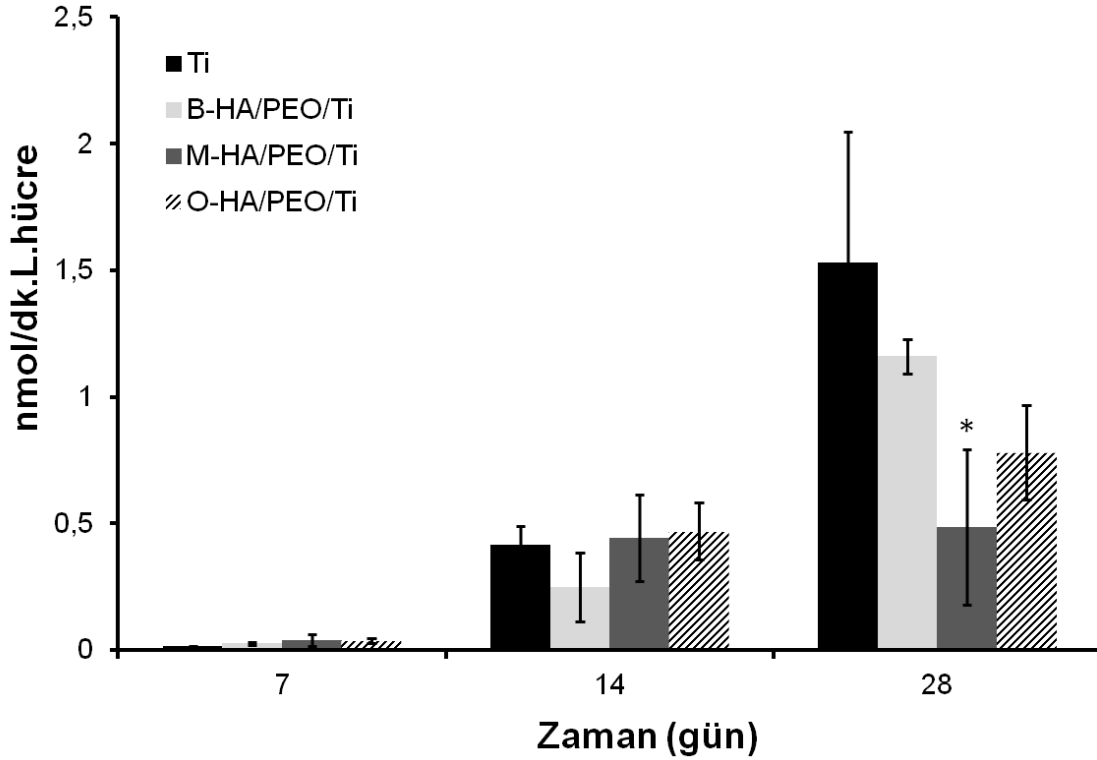
Şekil 4.18. Mikrodalga desteği ile üretilmiş bor katkılı HA içeren PEO fiberler ile kaplanmış Ti plakaların (B-HA/PEO/Ti) yüzeylerinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerinin (a,b,c,d) 7 ve (e,f,g,h) 28. gün SEM görüntüleri. (a) 2000, (b) 5000X, (c) 5000X, (d) 10000, (e) 2000X, (f) 5000X, (g) 10000X, (h) 15000X. Kırmızı oklar B-HA partikül kümeleri üzerinde çoğalan hücre tabakalarını göstermektedir.



Şekil 4.19. Oda sıcaklığında üretilmiş HA içeren PEO fiberler ile kaplanmış Ti plakaların (O-HA/PEO/Ti) yüzeylerinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerinin (a,b, c, d) 7 ve (e,f,g,h) 28. gün SEM görüntüleri. (a) 2,000X, (b) 5,000x, (c) 5,000X, (d) 15,000X, e) 2,000X, (f) 5,000X, (g) 5,000X, (h) 15,000X. (f) Kırmızı oklar, hücre dışı matris tabakalarını göstermektedir. (h) Kırmızı oklar, hücrelerin ürettiği kollajen fiberleri işaret etmektedir.

4.4.3. Alkalen Fosfataz (ALP) Analizi

Osteoblastik hücreler sayılarını arttırdıktan sonra hücre dışı matris salgılamaya başlarlar. Matris üretimini yüksek seviyelerde ALP üretimi ve matris modifikasyonu ile karakterize edilen farklılaşma fazı takip eder [143]. Alkalen fosfataz, hücre membranına bağlı olarak bulunan ve aktivitesi osteoblastik farklılaşma belirteci olarak kullanılan bir enzimdir. ALP enzimi pirofosfatları fosfata çevirerek HA kristallerinin oluşumunu desteklemektedir ve sert doku oluşumunun önemli bir bileşenidir [144]. ALP enzimi kemik oluşumu süresince sentezlenir. Kemik hücre dışı matriksinde minerallerin birikmesi sonucu osteoblastların osteositlere dönüşmesi ile aktivasyonu azalmaktadır [145]. Tez çalışması kapsamında, Ti plakalara ekilen hücrelerin osteojenik farklılaşmalarının kontrolü amacıyla ALP seviyeleri hücre kültürünün 7, 14 ve 28. günlerinde ALP analizi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.20. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait ALP grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur).

Şekil 4.20’te bulunan ALP seviyeleri incelenecek olursa 7. günden 14. güne sayısal olarak Ti grubunda 28 kat, B-HA/PEO/Ti ve M-HA/PEO/Ti grubunda 12 kat, O-HA/PEO/Ti grubunda ise 19 kat artış gözlenmektedir. 14. gün ALP

seviyeleri tüm gruplar arasında birbirine çok yakın ve anlamlı fark bulunmamaktadır. 28 gün seviyeleri incelendiğinde Ti ve B-HA gruplarının diğer HA içeren gruplara göre daha yüksek olduğu gözlenmektedir. 14. günden, 28. güne Ti ($p<0.01$) ve, B-HA/PEO/Ti ($p<0.001$) grupları istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. B-HA içeren grubun 28. günde ALP seviyelerinin en yüksek olduğu, M-HA/PEO/Ti grubuna göre sayısal olarak 2 kat O-HA/PEO/Ti grubuna göre 1.5 kat artmış olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. M-HA/PEO/Ti grubu, 14. günden 28. güne artış göstermemiş ALP seviyesi sabit kalmıştır.

Genel olarak ALP aktivite sonuçları incelenecek olursa 14. günden itibaren ALP aktivitelerinin yükseldiği belirlenmiştir. Özellikle SEM görüntülerinde de yoğun mineral yapılarını destekleyen (Şekil 4.18, Şekil 4.19) B-HA/PEO/Ti ve O-HA/PEO/Ti gruplarında ALP aktivitesi artmış ve B-HA/PEO/Ti grubunda, HA içeren gruplar arasında, en yüksek değere ulaşmıştır. Yapılan bu çalışmada PEO malzemelerinin hücre yapışması ve farklılaşmasındaki negatif etkilerine rağmen yapılan HA katkısının osteojenik farklılaşmayı desteklediği belirlenmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalar elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Ravichandran ve ark. [122], PLGA/kollajen nanofiber kaplı Ti plakaların yüzeylerini biyomimetik yöntemle nano-HA ile işlevselleştirmiş ve insan mezenkimal kök hücreleri (hMSC) kullanarak ALP aktivitelerini karşılaştırılmıştır. Bu çalışma ile HA gibi mineralize malzemelerin ALP aktivitelerinin 14. günden itibaren arttığı ve mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasını desteklediği sonucuna varılmıştır.

Bölüm 4.4.1'de hücre yapışmasına etkilerinden bahsedilen Ito ve arkadaşlarının [142] yaptığı çalışmada biyomimetik yöntemle üretilen HA ve PEG kompozit hidrojellerinin osteoblastik aktiviteleri MG63 insan osteoblast benzeri hücreleri ALP aktivite analizleri ile incelenmiştir. Bu çalışma ile düşük kristal yapıya sahip HA'lerin ALP aktivitelerinin daha yüksek olduğu ve etkili bir şekilde kemik oluşumunu desteklediği belirlenmiştir.

4.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

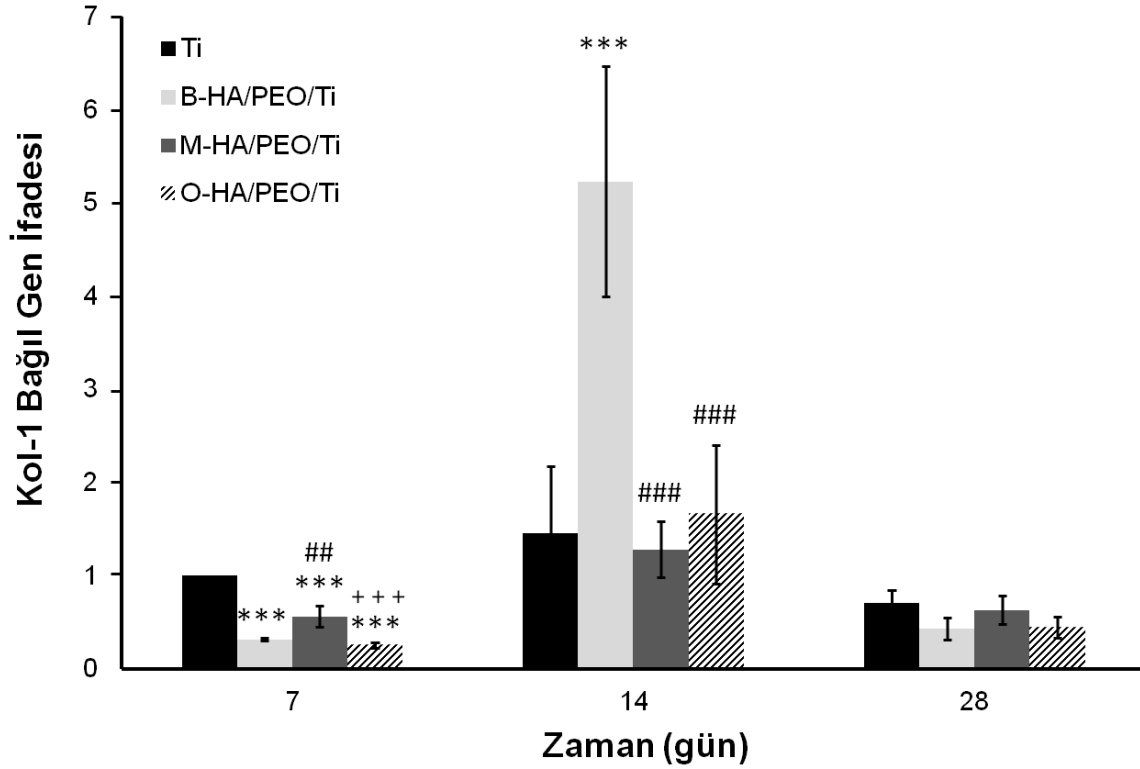
Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, nükleotik asit miktarının belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem, DNA çoğaltılması sırasında, çift zincirli (ds) DNA'ya bağlanan SYBR-Green I gibi floresan boyaların ışımaları izlenerek, DNA

kopya sayılarını sayısal değerlere dönüştürüp kantitatif sonuçlar alınmasına olanak sağlamaktadır. RT-PCR yöntemi, hem DNA üzerindeki hedeflenen bölgenin çoğaltılması hemde çoğaltılan ürünlerin saptanması aynı cihaz içerisinde gerçekleştirilen, klasik PCR yönteminde ihtiyaç duyulan elektroforeze gerek kalmadan kısa sürede analizlerin yapıldığı pratik bir yöntemdir.

Hücrelerin çeşitli gen ekspresyon seviyeleri mRNA miktarlarıyla belirlenebilmektedir. PCR analizleri için öncelikle hücrelerden RNA izolasyonları yapılır ve ardından reverse transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilir. Elde edilen cDNA molekülleri PCR analizlerinde kullanılır.

Malzeme yüzeyine ekilen osteoblastik hücreler, hücre sayılarını artırarak ECM üretimi gerçekleştirirler. Farklılaşma ile birlikte OCN, ALP, KOL-1 gibi çeşitli kemiğe özel bazı genlerin seviyelerinde artışlar gözlenmektedir [146]. Farklılaşma fazı yüksek seviyede ALP üretimi ve matris modifikasyonu ile karakterize edilmektedir. Kollajen tip 1, mineralize matris oluşumundan önce üretilen hücre dışı matriksin önemli bileşenlerinden biridir. Osteokalsin ve BSP ise osteoblastlar tarafından salınan, mineralizasyon ve matris oluşumunu düzenleyen kemik bağımlı belirteçleridir [147].

Tez çalışması kapsamında, Ti plakalara ekilen hücrelerin osteojenik farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla hücrelerdeki kollajen-I (KOL- I), Runx2, osteokalsin (OCN) ve osteopontin (OPN) genlerinin ifade seviyeleri, RT-PCR ile belirlenmiştir. Ekspresyon seviyeleri housekeeping gen olan β -aktin ile normalize edilmiş, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24 'de verilmiştir.



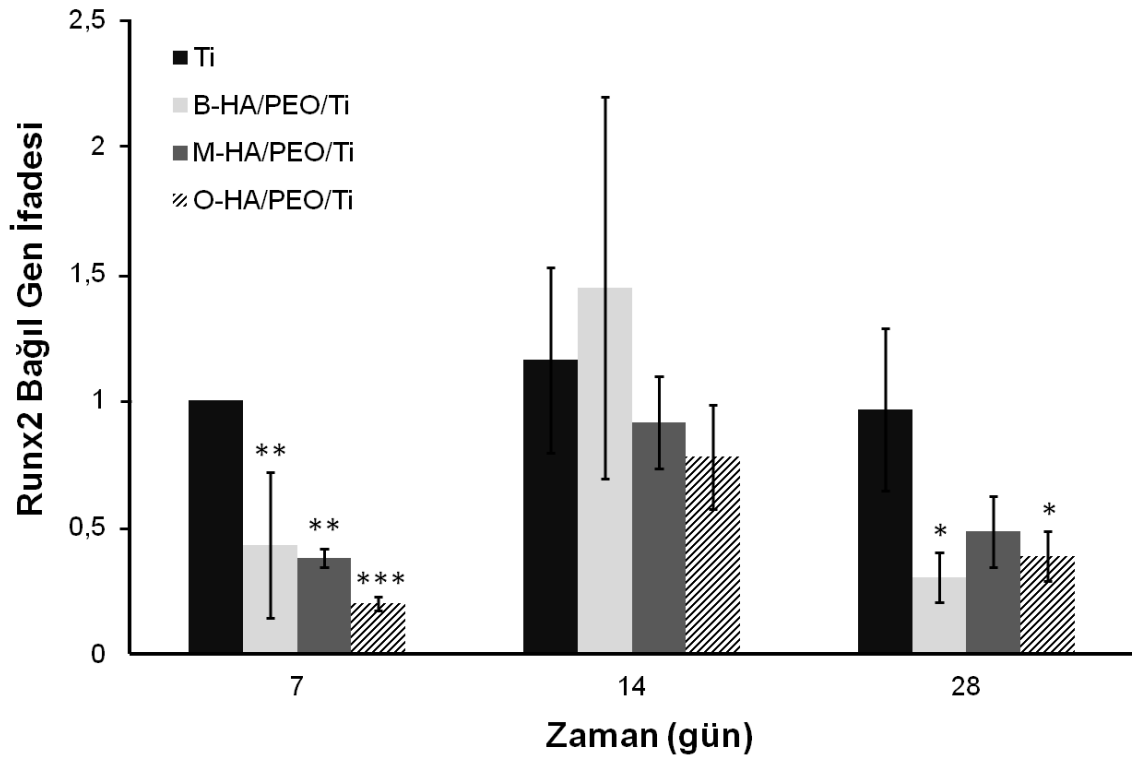
Şekil 4.21. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait KOL-1 gen ifadesi grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur); # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 (B-HA/PEO/Ti kontrol grubudur) ; + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001 (M-HA/PEO/Ti kontrol grubudur).

Yeni kemik oluşumu sırasında hücrelerin çoğalmasıyla birlikte osteoblast hücrelerinden ilk olarak kollajen tip 1 sentezi gerçekleşmektedir. Osteoblast hücrelerinin olgunlaşmasının ileri dönemlerinde KOL-1 sentezi düşmektedir [148].

Titanyum plakalar üzerindeki hücrelerin kollajen-1 (KOL-1) gen ekspresyon seviyeleri, Şekil 4.21.'de verilmiştir. Çoğalan hücrelerden erken dönemde salgılanan KOL-1, 7 günde Ti grubunda diğer gruplara göre daha yüksek seviyede ifade olmuştur (p<0.001). Yedinci günden, 14. güne B-HA/PEO/Ti (p<0.001), M-HA/PEO/Ti (p<0.05), O-HA/PEO/Ti (p<0.01) anlamlı olarak arttığı Ti grubunda ise sayısal bir artış gözlenmesine rağmen anlamlı bir fark bulunmamaktadır. B-HA/PEO/Ti grubunda 7. güne göre 14. günde 8 katlık büyük bir artış olduğu gözlenmiştir. Borlu HA içeren grupta kollajen ekspresyonu 14. günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır ve tüm diğer gruplarla aralarında sayısal ve istatistiksel olarak oldukça anlamlı (p<0.001) fark bulunmaktadır. 28.günde KOL-1

ekspresyonunun hücrelerin farklılaşmaya yönelmeleri nedeniyle tüm gruplarda düştüğü gözlenmiştir.

Ying ve ark.[149]'nın farklı bor konsantrasyonlarının kemik iliği stromal hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada, KOL-1 gen ifadesinin 7. günde bor eklenen gruplarda artırdığı gözlenmiştir. Tunçay ve Gümüşderelioğlu'nun [9] MC3T3-E1 hücreleriyle yaptıkları bir çalışmada, borlu HA ve HA ile işlevselleştirilmiş kompozit kitosan doku iskelelerinin, KOL-1 ekspresyon seviyelerinin kontrol gruba göre arttığı ve 14. günde en yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. Ayrıca, RT-PCR analizleri, bor katkısının, HA'e göre, KOL-1 ekspresyonunu ($p<0.001$) desteklediğini göstermiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada ise [10] borik asitli-kitosan nanopartikül içeren, kitosan doku iskelelerinde, bor ile desteklenmiş grupların, 14. gün KOL-1 gen ifade seviyelerinin kitosan gruba göre yüksek olduğu ($p<0.01$) gözlenmiştir.

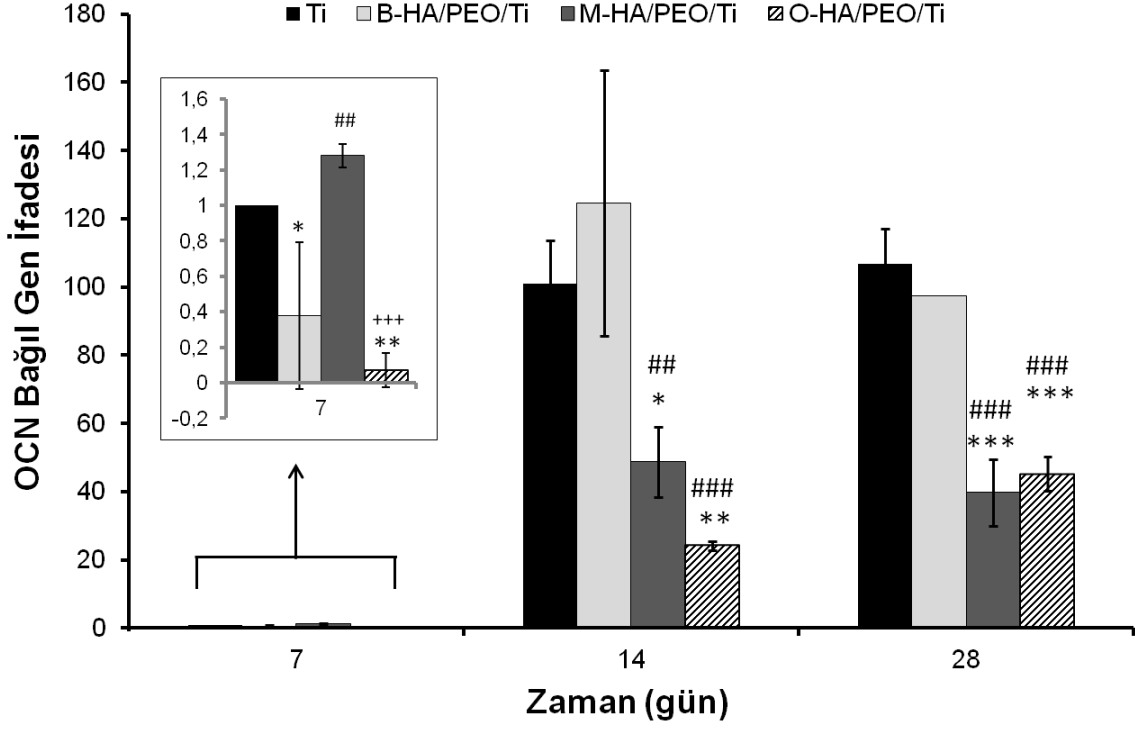


Şekil 4.22. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait Runx2 gen ifadesi grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (Ti kontrol grubudur).

Runx2, kondrosit ve osteoblast farklılaşmasını düzenleyerek iskelet gelişimini kontrol eden multifonksiyonel transkripsiyon faktörüdür. Osteojenik farklılaşmanın erken dönemlerinde üretilerek, osteoblast farklılaşması süresince birçok hücre dışı matris proteinlerinin gen ifadelerinin düzenlenmesinde görev alır [150].

Ti plakalar üzerindeki hücrelerin, Runx2 gen ifadeleri incelendiğinde (Şekil 4.22), Ti grubunda, 7.günden 14. güne az miktarda artış göstermişken, B-HA/PEO/Ti ($p<0.05$), M-HA/PEO/Ti ($p<0.01$) , O-HA/PEO/Ti ($p<0.01$) gruplarında belirgin artış gözlenmektedir. Tüm gruplar için Runx2 gen ifadeleri 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 7. ve 14. gün B-HA içeren grupların gen ifadeleri, M-HA ve O-HA içeren gruplara göre sayısal olarak daha yüksek olmasına rağmen, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. 28. günde HA içeren tüm gruplarda Runx2 gen ifadelerinde düşüş gözlenmektedir ($p<0.05$). Ti grubu ise 7, 14, 28 günleri boyunca Runx2 gen ifade seviyelerinde çok büyük değişiklikler göstermemiş, sabit seyretmiştir.

Wu ve ark [151], farklı konsantrasyonda bor içeren porlu mezopor biyoaktif camlarla yaptıkları çalışmada, bor salımları ve borun insan osteoblast hücreleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Kontrollü bir şekilde bor salımı sağlayan biyoaktif camların, hücre proliferasyonunda 1. günden 14. güne kadar logaritmik olarak artış olduğu, kültürün 14. günlerinde ise bor eklenmiş olan gruplarda KOL-1 ve Runx2 gen ifadelerinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir.



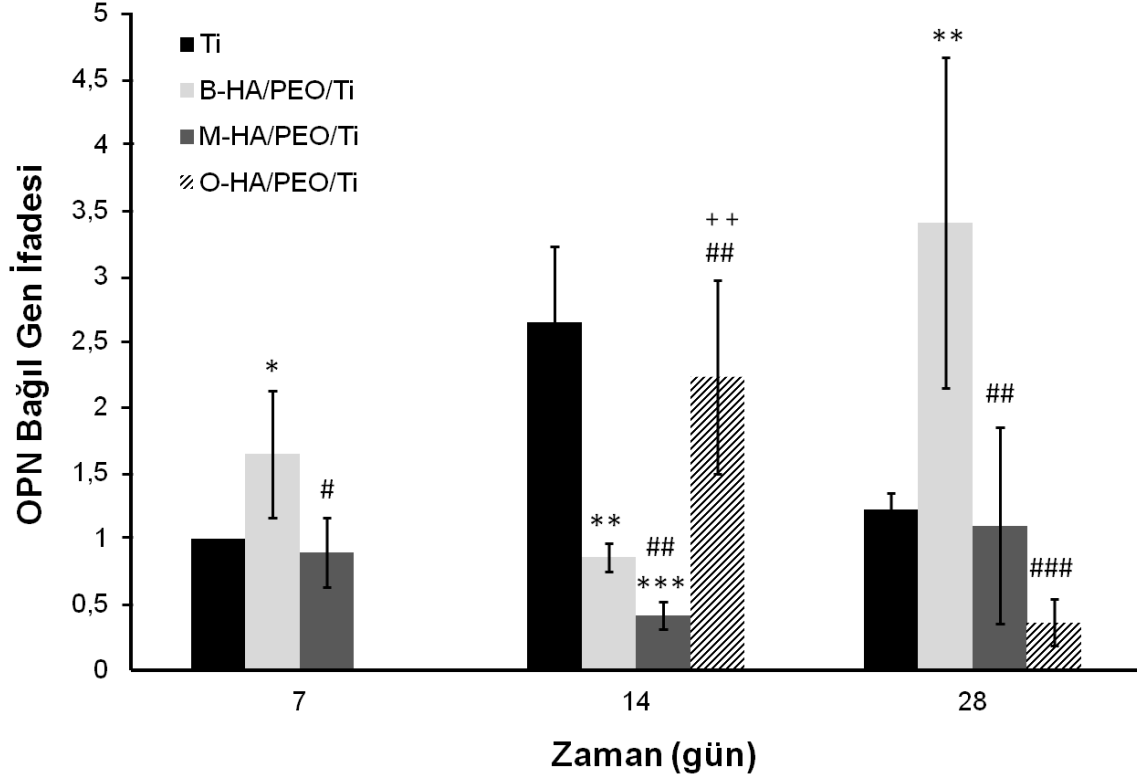
Şekil 4.23. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait OCN gen ifadesi grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur); # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 (B-HA/PEO/Ti kontrol grubudur).

Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenen, farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkan, non-kollajenöz proteindir. En yüksek seviyesine kemik matürasyonu sağladıktan sonra ulaşır ve mineralize dokuya spesifik bir proteindir [148].

Osteokalsin gen ekspresyonları incelendiğinde (Şekil 4.23) tüm gruplarda 7. günde gen ifadeleri çok düşükken, 14. günden itibaren tüm gruplarda (p<0.001) yüksek oranda arttığı gözlenmektedir. 7.günden 14.güne, Ti (p<0.001), B-HA/PEO/Ti (p<0.001), M-HA/PEO/Ti (p<0.001), OCN gen ekspersyonlarının arttığı ve 28 günde sabit kaldığı gözlenirken (p>0.05), O-HA/PEO/Ti grubunda 7. günden 28.güne logaritmik olarak arttığı ve en yüksek seviyesine ulaştığı gözlenmektedir. B-HA/PEO/Ti grubunda OCN, en yüksek seviyeye 14. günde ulaşmakta ve diğer HA içeren gruplara göre (M-HA, p<0.01, O-HA, p<0.001) aralarında anlamlı fark bulunmaktadır.

Tunçay ve Gümüşderelioğlu [9] B-HA ve HA katkılarının, Runx2 ve OCN gen ifadelerine etkileri incelendiğinde iki grubunda, kültürün 21. günde maksimum

seviyeye ulaştığı ve kontrol grubuna göre aralarında büyük fark ($p<0.001$) olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma ile B-HA kaplanmış olan kitosan iskelelerinin osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerini arttırdığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.24. Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait OPN gen ifadesi grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (Ti kontrol grubudur); # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ (B-HA/PEO/Ti kontrol grubudur); + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$ (M-HA/PEO/Ti kontrol grubudur).

Osteopontin, kemiğin şekillendirilmesinde görev alan farklılaşmanın geç evrelerinde mineralizasyonu inhibe etmekte görevli olan, önemli bir proteindir [152].

Osteopontin gen ekspresyonları incelendiğinde (Şekil 4.24), 7. gün B-HA içeren grupta OPN gen ifadesinin en yüksek olduğu ve tüm gruplarla arasında anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir. Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti gruplarında 7 günden 14.günde OPN ifadelerinin anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0.001$) ancak B-HA/PEO/Ti ve M-HA/PEO/Ti grubunda 14. günde sayısal olarak bir azalma ($p>0.05$) gözlenmektedir. B-HA/PEO/Ti grubunun OPN ekspresyon oranı 28. günde en

yüksek seviyesine ulaşmıştır ve Ti, M-HA/PEO/Ti ($p<0.05$), O-HA/PEO/Ti ($p<0.001$) aralarında anlamlı bir fark gözlenmektedir.

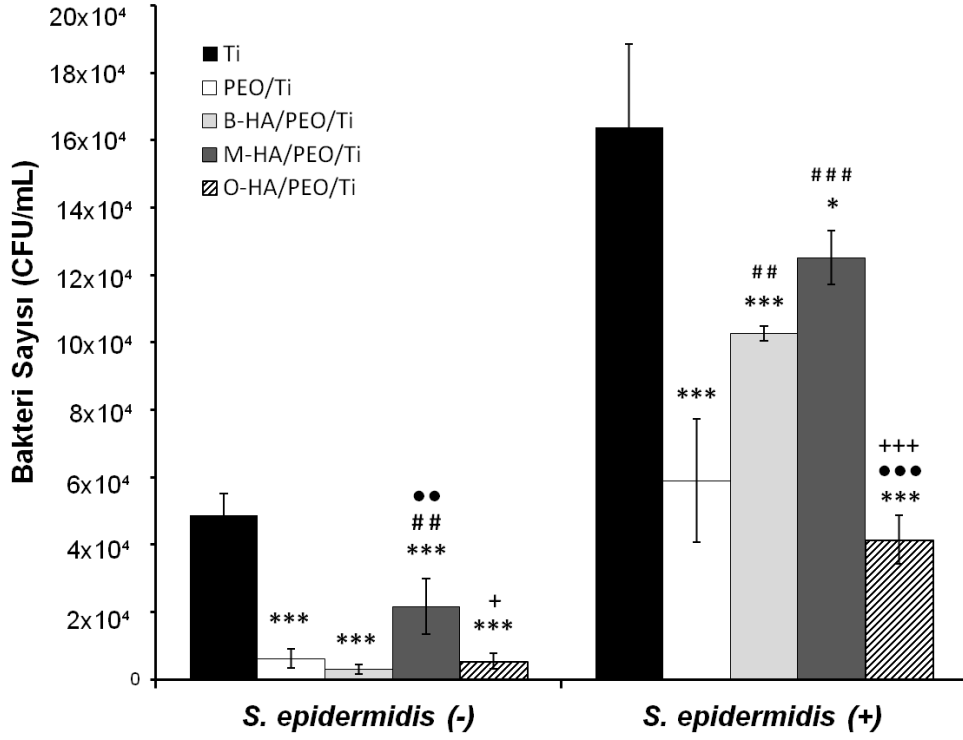
Genel olarak hücre kültürü sonuçları değerlendirildiğinde, PEO fiberlere HA katkısının hücre proliferasyonunu, Ti plakalar kadar desteklediği ancak PEO fiberler kaplanmış olan Ti plaka yüzeylerine hücre yapışması yeterli olmadığı SEM görüntüleriyle ve MTT değerleriyle belirlenmiştir. RT-PCR sonuçları ve literatür karşılaştırıldığında PEO kaplamanın kemik öncülü hücrelerin malzeme yüzeyine yapışması, farklılaşması üzerine negatif etkilerine rağmen HA katkısının hücre yapışması, farklılaşmayı arttırmamış ve hücre dışı matris oluşumunu desteklediği belirlenmiştir. Bu çalışmalar borun sahip olduğu osteoindüktif ve osteokondüktif etkileri nedeniyle diğer HA içeren gruplara göre hücre farklılaşmasını büyük oranda desteklediğini göstermiştir.

4.5. Antibakteriyel Etkinin Belirlemesine Yönelik Çalışmalar

Bakterilerin, biyomalzeme yüzeyine yapışması ve çoğalması, genellikle biyofilm oluşumuyla sonuçlanmakta ve sağlık açısından ciddi sorunlara neden olmaktadır. İmplant kaynaklı enfeksiyon tedavilerinde, sistemik dolaşıma verilen antibiyotikler, biyofilm oluşumunu engellemede yetersiz kalmakta ve antibiyotik kullanımına bağlı olarak dirençli mikroorganizmaların çoğalması ve yayılmasına neden olmaktadır. Bu problemleri çözebilmek için birincil bakteri yapışmasını ve biyofilm oluşumunu engelleyen antibakteriyel yüzeyler geliştirilmektedir [36]. Yüzey uygulamaları, bakterisit etki gösteren yüzey kaplamaları olabildiği gibi bakteri dirençli yüzey modifikasyonları olarak da uygulama alanı bulmaktadır. Bakterisit özelliğe sahip kaplamalar, malzeme yüzeyinde canlı biyofilm oluşumunu engellemesine rağmen yüzeyde kalan ölü bakteri kalıntıları, yangıya veya immün cevaba neden olabilmektedir. Bu nedenle bakteri yapışmasını engelleyen yüzey kaplamaları ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır [48].

Mikroorganizmaların (sesil) yüzeye bağımlı, biyofilm oluşturan ve (planktonik) serbest olarak yüzen iki formu bulunmaktadır. Stafilokoklar yüksek frekansta fenotipik çeşitlilik göstermektedirler. Bu fenotipik farklılıklar, gen ifadelerinde değişikliklere sebep olmaktadır. Yüzen planktonik hücreler fenotipik değişiklikler göstererek yüzeye yapışan ve biyofilm oluşumuna neden olan sesil forma dönüşmektedir [153]. Yapılan antibakteriyel çalışmada PEO fiber kaplamaların bakteri tutunması üzerine etkileri incelenmiş ve çalışma esnasında biyofilm

oluşturan *S. epidermidis* (ATCC 35984) ve biyofilm oluşturmayan *S. epidermidis* (ATCC 12228) olmak üzere 2 farklı bakteri suşu kullanılarak, kültür çalışmaları yapılmıştır. Çalışma basamaklarında Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti olmak üzere 5 farklı deney grubu hazırlanmış ve antibakteriyel etkinlikleri karşılaştırılmıştır.



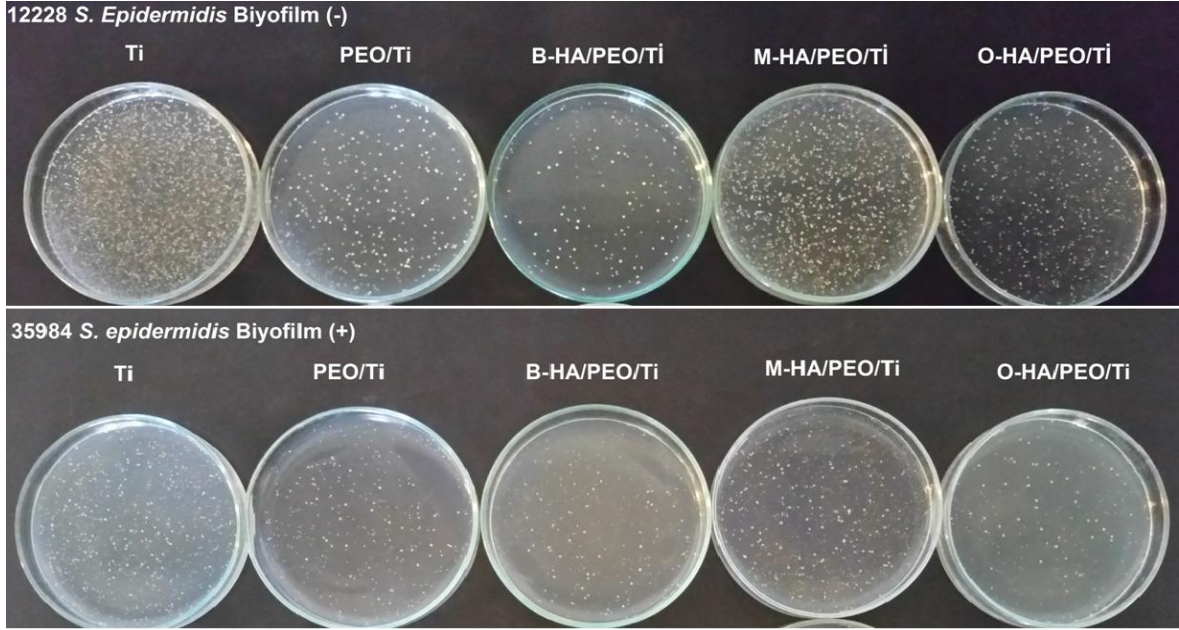
Şekil 4.25. *S. epidermidis* (ATCC 12228), biyofilm(-) ve *S. epidermidis* (ATCC 35984), biyofilm(+) suşlarının; Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti yüzeyler üzerindeki tutunma grafikleri. İstatistiksel anlam farklılığı, n=4 * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Ti kontrol grubudur); # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 (PEO/Ti kontrol grubudur); • p<0.05, •• p<0.01, ••• p<0.001 (B-HA/PEO/Ti kontrol grubudur); + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001-M-HA/PEO/Ti kontrol grubudur).

Şekil 4.25’de 2 saatlik malzeme-hücre inkübasyonu sonrasında, Ti plaka yüzeylerine tutunan bakteri sayılarının, koloni sayım yöntemiyle belirlendiği grafik bulunmaktadır. Koloni sayımları sonucunda iki tip suşdan; *S. epidermidis* 12228’in malzeme yüzeyine yapışan bakteri yoğunluğunun, *S. epidermidis* 35984 bakteri yoğunluğuna göre daha az olduğu gözlenmiştir. Yani iki farklı suş kıyaslandığında Ti plakaların yüzeylerine, biyofilm oluşturan ve yüzeye bağımlı olan bakteri

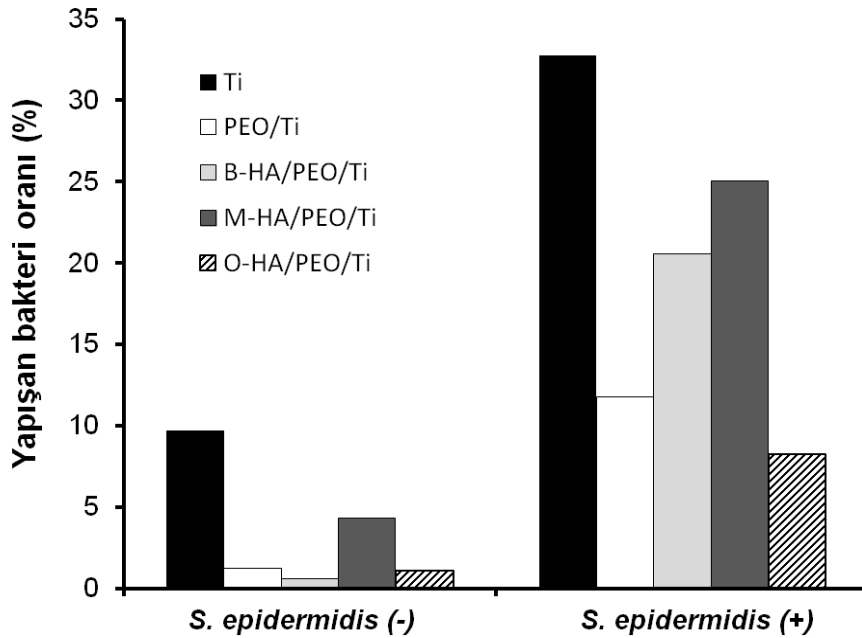
suşunun, daha fazla yapıştığı sonucuna varılmıştır.

Kaplama yapılmamış Ti plaka yüzeylerine, biyofilm negatif *S.epidermidis* suşunun diğer gruplara kıyasla oldukça fazla miktarda ($p<0.001$) yapıştığı, ortama eklenen bakteri miktarının yaklaşık olarak %10'luk bir kısmının (Şekil 4.27) malzeme yüzeyine tutunduğu gözlenmektedir. Biyofilm negatif (ATCC 12228) suşla yapılan diğer sayım çalışmaları incelendiğinde, PEO kaplamaların (HA içeren veya içermeyen) yüzeye tutunan hücre sayılarını, Ti grubuna göre belirgin bir şekilde azalttığı dikkat çekmektedir. HA eklenmiş olan gruplar arasında, ATCC 12228 suşunun en çok M-HA/PEO/Ti plaka yüzeyine yapıştığı gözlenmiştir. Biyofilm pozitif (ATCC 35984) suşunda ise PEO/Ti grubu, Ti' a göre ($p<0.001$) belirgin bir şekilde bakteri yapışmasını azaltmıştır. B-HA/PEO/Ti ve M-HA/PEO/Ti plaka yüzeylerine, O-HA/PEO/Ti ($p<0.001$) grubuna göre çok daha fazla hücre yapışmış olmasına rağmen Ti grubuna göre hücre yapışmasını azaltmış ve aralarında oldukça anlamlı (B-HA/PEO/Ti, $p<0.001$; M-HA/PEO/Ti, $p<0.05$) fark olduğu gözlenmiştir. O-HA/PEO/Ti ile PEO/Ti grupları karşılaştırıldığında bakteri yapışmasını Ti plakalara göre benzer oranlarda (Şekil 4.25 ve 4.27) engellediği gözlenmektedir.

Şekil 4.26'da malzeme yüzeyinden yıkanan hücrelerin koloni sayımlarının gerçekleştirildiği petri fotoğrafları bulunmaktadır. Bakteri koloni boyutlarının farklı olması, yapışan bakteri sayıları arasında büyük fark olmasından dolayı ve sayımın daha kolay yapılması için 2 farklı seyreltme oranında hazırlanan petrilerde, Ti grubunun yoğun koloni dağılımları gösterdiği ve PEO kaplamalarıyla yoğunluğun azalmış olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 4.26. *S. epidermidis* (ATCC 12228), biyofilm(-) ve *S. epidermidis* (ATCC 35984), biyofilm(+) suşlarının; Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti gruplarında yapışma analizi hücre koloni görüntüleri. (12228 bakteri suş gruplarının sulandırma katsayısı 1:10), (35984 suş gruplarının sulandırma kat sayısı 1:200).



Şekil 4.27. *S. epidermidis* (ATCC 12228), biyofilm(-) ve *S. epidermidis* (ATCC 35984), biyofilm(+) suşlarının; Ti, PEO/Ti, B-HA/PEO/Ti, M-HA/PEO/Ti, O-HA/PEO/Ti yüzeyler üzerindeki yüzde tutunma grafikleri.

Şekil 4.27 incelenecek olursa M-HA/PEO/Ti plakalara yapışan biyofilm (-) bakteri oranının diğer HA içeren gruplara göre daha yüksek olduğu, biyofilm(+) oranının ise hem M-HA/PEO/Ti, hem de B-HA/PEO/Ti gruplarında fazla olduğu gözlenmektedir. Yapışan bakteri oranına malzemeye eklenen HA partikül boyutları ile hücrelerin yaptığı etkileşimler ve malzemenin pürüzlülüğü önemli rol oynamaktadır. Şekil 4.8'de boş PEO fiberler ve HA eklenmiş PEO fiberler ile kaplanmış Ti plakaların hücre ekilmeden, 3. gün hücre kültür ortamında bekletilmiş SEM görüntüleri bulunmaktadır. Yapısına su alarak hidrojel formuna geçen PEO fiberler [79], 3.gün sonunda malzeme yüzeyini tamamen kaplamış ve düz bir yüzey oluşturmuştur. M-HA ve B-HA eklenmiş olan gruplar büyük HA kümeleri halinde yüzeye dağılmış ve pürüzlü bir özellik kazandırmıştır. O-HA içeren PEO kaplamalarda ise partiküller daha küçük ve daha az kümeler halinde malzeme yüzeyine yayılmıştır. O-HA içeren grup, diğer HA içeren gruplarla kıyaslandığında daha az pürüzlülüğe sahip bir yüzey özelliği sağlamaktadır. Tüm bu analizler sonucunda M-HA ve B-HA gruplarındaki hücre yapışma oranlarının fazla olması, HA partiküllerinin malzeme yüzeyinde oluşturduğu pürüzlü topografyadan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde yapılan çalışmalarda, HA yapısının hücre yapışmasına etkisi tez çalışmasını destekler niteliktedir. Ribeiro ve Ferraz [154] farklı sıcaklıklarda sinterlenerek hazırlanan HA malzemelerin, farklı stafilokok suşlarının yapışma davranışları üzerine etkileri incelemiştir. Yapılan çalışmada 725°C'de sinterlenen nano-Hidroksiapatit (nHA) yapıların 1000°C sıcaklıkta sinterlenen nHA'lere göre daha yüksek yüzey alanına sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca daha fazla 725°C'de sinterlenen nano-Hidroksiapatit daha fazla porlu yüzey yapısına sahiptir. Metisilin dirençli ve dirençsiz *S. aureus* (MSSA, MRSA), *S. epidermidis* (ATCC 35984) ve *S. epidermidis* hastane kaynaklı suşlarıyla yaptıkları koloni sayım çalışmalarında daha yüksek pürüzlülüğe sahip olan HA yüzeylerine yapışan bakteri sayısının tüm suşlarda belirgin bir şekilde daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Siswomihardjo ve ark. [155] zirkonya ile mekanik özellikleri artırılmış olan HA biyomalzemelerin *S.epidermidis* yapışmasını engellediğini belirtmiştir. Yapılan çalışmada HA yüzey pürüzlülüğünün, Zr-HA gruplarına göre daha fazla olduğu, Zr katkısı ile HA malzeme yüzeyindeki porların dolmasıyla daha pürüzsüz bir yüzey özelliğine sahip olduğunu SEM analizleriyle gözlemlemişler.

Şimşek ve Gümüşderelioğlu [79], PEO ile kaplanmış Ti plakaların *S.epidermidis* suşu üzerine antibakteriyel etkinliklerini incelemişlerdir. 24 saatlik bakteri inkübasyonu sonrasında Ti plakalarla PEO kaplı plakaların yüzeyinde bulunan bakteri miktarları SEM görüntüleriyle karşılaştırılmış ve PEO ile kaplamaların etkili bir şekilde malzeme yüzeyine yapışan bakteri miktarını azalttığı ve büyük koloni oluşumlarının bu guruplarda gözlenmediği sonucuna varmışlardır.

Khoo ve ark. [156] Ti plakalara antibakteriyel etkinlik kazandırmak amacıyla PEG kaplama yapmış ve *S. aureus* suşu ile antibakteriyel etkinliği incelenmiştir. PEG ile kaplanmış olan yüzeylerin Ti göre bakteri yapışmasını büyük oranda azalttığı gözlenmiştir.

Kaper ve ark.[67] PEO fırça yapısı ile kaplanmış olan cam yüzeylerin *S. epidermidis* hücrelerinin yapışmasını normal cam yüzeylere göre engellediğini göstermişlerdir.

Tüm bu sonuçlar ve literatür karşılaştırıldığında, Ti plakalara göre tüm PEO fiber kaplamalarının her iki bakteri suşu içinde başarılı olduğu, hücre yapışmasını belli oranlarda azalttığı gözlenmektedir. Özellikle O-HA/PEO/Ti grubu bakteri yapışmasını desteklemeyen, en yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olan grup olarak belirlenmiştir. O-HA/PEO/Ti grubu hücre kültürü MTT sonuçları ve SEM görüntüleri değerlendirildiğinde, MC3T3-E1 perosteoblast hücrelerinin malzeme yüzeylerine yapışmasını, diğer HA grupları kadar başarılı desteklediği ve PEO'in etkisine rağmen, hücre yapışmasını Ti plakalar kadar arttırmış olduğu gözlenmiştir. PCR sonuçları ise O-HA/PEO/Ti grubunun hücre farklılaşmasını desteklediği ancak Bor katkılı HA sonuçlarına göre, osteoblast farklılaşmasını daha az desteklediği sonucuna varılmıştır. Tüm gruplar arasında antibakteriyel etkinliği en düşük olan grup M-HA/PEO/Ti gurubu olarak belirlenmiştir. Hücre kültürü karakterizasyonlarında O-HA/PEO/Ti grubuna yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bor içeren grup ise antibakteriyel etkinliği M-HA/PEO/Ti grubuna göre daha yüksek olan, hücre farklılaşmasını diğer tüm diğer HA gruplarına ve Ti'ye göre çok en yüksek seviyede destekleyen grup olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar, hazırlanan Ti yüzey kaplamalarının osseointegrasyonu büyük oranda desteklediği diğer yandan bakteri hücrelerinin yapışmasını azaltıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Biyomimetik yöntemle HA hazırlanması

yapısına pek çok molekül katılmasına olanak sağlamaktadır. Yapılan tez çalışmasında hazırlanan kaplamalar çeşitli antimikrobiyal ajan ve biyosinyal moleküllerle desteklenerek daha kuvvetli antibakteriyel özellik ve daha etkili osteojenik özellikler kazandırılarak klinik uygulamalarda kullanılacak bir implant malzemesi üretilmesine olanak sağlamaktadır.

5.GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında titanyum implant yüzeylerine, bakteriyel hücre yapışmasını engelleyen ve kemik oluşumunu destekleyen kaplamalar yapılmıştır. Antibakteriyel etki, PEO fiberlerle sağlanmış, kemik oluşumu ise SBF kullanılarak biyomimetik yöntemle üretilen HA partiküllerle gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda gözlenen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- ❖ Çalışmanın birinci aşamasında Ti malzemelere yüzey uygulamaları yapılmıştır. Mekanik uygulamayla malzeme yüzeyinde amorf yapıda olan titanyum oksit tabakası ve üretimden kaynaklı kirlilikler uzaklaştırılmış, yüzeyde pürüzlülük oluşturularak nanofiber kaplamalar için malzeme yüzey alanı artırılmıştır.
- ❖ Ti plakalara farklı sürelerde asitle aşındırma basamağı uygulanmış ve yüzey karakterizasyonlarıyla (NaOH ve HCl de uygulandıktan sonra) en uygun süre belirlenerek, malzeme yüzeyinde nano boyutta pürüzler oluşturulmuştur.
- ❖ Asit uygulamasının ardından NaOH ve HCl ile Ti plaka yüzeyleri muamele edilmiş, öte yandan apatit oluşumu, hücre yapışması ve kaplama kararlılığını da etkileyecek olan daha hidrofilik özelliğe sahip titanyum oksit tabakası oluşturulmuştur.
- ❖ 10xSBF çözeltisi içerisine Ti plakalar daldırılarak hem malzemenin biyoaktivitesi incelenmiş, hem de oda sıcaklığında kendiliğinden çekirdeklenmelerin oluşum süreleri ve uygun apatit formunun oluşturulduğu süreler belirlenmiştir. Ti yüzeylere yapılacak olan kaplamalarda kullanılmak üzere belirlenen sürelerde (18 sa) mikrodalga enerjisi uygulanmadan HA partikül (O-HA) üretimi gerçekleştirilmiştir.
- ❖ Mikrodalga enerjisi kullanılarak kemik benzeri yapıya sahip SBF çözeltisinden HA (M-HA) ve borik asit içeren SBF çözeltisinden bor katkılı HA (B-HA) partikül üretimi gerçekleştirilmiştir.
- ❖ Üretilen HA partiküller PEO çözeltileri içerisine karıştırılarak elektroçirme yöntemiyle Ti plaka yüzeylerine kaplanmıştır. Uygun HA oranları belirlenmiş ve % 20 oranında HA eklenmesi kararlaştırılmıştır. Çap kalınlıkları PEO/Ti=210±41 nm, B-HA/PEO/Ti=200±51 nm, M-HA/PEO/Ti=195±81 nm ve O-HA/PEO/Ti=203±25 nm olan fiberlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. HA

partiküllerin fiber iç ve dış kısımlarında konumlandığı, TEM ve SEM görüntüleri ile gözlenmiştir. Ayrıca, B-HA ve M-HA partiküllerin daha büyük kümeler oluşturarak fiberlerin dışında konumlandığı, O-HA partiküllerin ise büyük kümelenebilirlikler oluşturmadan fiberler içerisinde dağıldığı gözlenmiştir.

- ❖ MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri kullanılarak yapılan hücre kültür çalışmalarında hücre canlılığının kontrolü MTT analizleri ile yapılmış ve PEO fiber yapısına HA katkısının hücre yapışmasını büyük oranda arttırdığı gözlenmiştir. Ti, M-HA/PEO/Ti, B-HA/PEO/T, O-HA/PEO/Ti gruplarında hücre çoğalması 14. güne kadar logaritmik olarak artmış, öte yandan PEO/Ti grupları ise hücre yapışmasını ve çoğalmasını yeterli oranda desteklememiştir.
- ❖ PEO/Ti yüzeylerinde üremiş olan MC3T3 hücrelerinin SEM görüntüleri, hücre-malzeme etkileşimlerinin yeterli olmadığını göstermiştir. HA içeren grupların görüntülerinde ise hücrelerin malzeme yüzeyine yapışarak, yayıldığı ve kültürün 28. gününde yoğun hücre dışı matris üretimi sonucunda yoğun katmanlar oluştuğu gözlenmiştir.
- ❖ Ti plaka yüzeylerinde üremiş olan MC3T3 hücrelerinin ALP aktiviteleri tüm gruplarda 14.günden itibaren yükselmiştir. ALP aktivitesi, B-HA içeren grupta 28. günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır ve diğer HA içeren gruplara göre sayısal olarak daha yüksek değerlerdedir. Ayrıca 28. günde tüm gruplarda yükselmiş olan ALP aktiviteleri SEM görüntülerindeki yoğun mineral katmanlarını destekler niteliktedir.
- ❖ Ti plakalara ekilen hücrelerin osteojenik farklılaşmalarının belirlenmesi amacıyla Kol-1, Runx2, OCN ve OPN gen ifade seviyelerinin belirlendiği RT-PCR analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda Kol-1 gen ifade seviyelerinin tüm gruplarda 14. günde arttığı gözlenmiştir. 14. günde B-HA/PEO/Ti grupta, Kol-1 gen ifadesi çok yüksek seviyelere ulaşmış ve diğer tüm gruplarla arasında oldukça anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir. Öte yandan 28. günde tüm gruplarda osteoblast olgunlaşması ile birlikte Kol-1 gen ifadelerinde düşüş gözlenmiştir. Erken dönem farklılaşma belirteci olan Runx2 gen ifadelerinin, 14. günde tüm gruplarda artış gösterdiği gözlenmiştir. B-HA/PEO/Ti grubu sayısal olarak daha yüksek gen ifade seviyeleri göstermesine rağmen diğer gruplarla arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Geç dönem osteoblastik farklılaşma belirteci olan OCN

gen ifadesi, 14 günden itibaren tüm gruplarda yükselmiştir. 14. ve 28. günlerde en yüksek OCN seviyesi Ti ve B-HA/PEO/Ti gruplarında gözlenmiştir ve diğer HA içeren gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Farklılaşmanın son dönemlerinde matrisin olgunlaşması süresince ifade olan OPN gen ifadeleri, Ti ve O-HA-PEO/Ti gruplarında 14. günde belirgin bir şekilde yükselmiş ancak 28. günde seviyelerde düşüş gözlenmiştir. Kültürün 28. gününde, B-HA/PEO/Ti grubunun OPN gen ifadesi en yüksek seviye ulaşmış ve tüm gruplar arasında anlamlı bir fark olacak şekilde artmıştır.

- ❖ MC3T3 hücreleriyle yapılan hücre kültür çalışmaları PEO fiber yapısına HA katkısının hücre yapışması, proliferasyonu ve farklılaşmasını desteklediğini göstermiştir. Tüm HA içeren gruplar arasında osteoindüktif ve osteokondüktif özellikte olan B-HA katkısının hücre farklılaşmasını büyük oranda desteklediği belirlenmiştir.
- ❖ *S. epidermidis* biyofilm (+) ve biyofilm (-) suşları ile yapılan antibakteriyel çalışmalar, Ti plakalara PEO ile yapılan kaplamaların hücre yapışmasını büyük miktarda engellediğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda O-HA/PEO/Ti grubunda antibakteriyel etkinliğin en yüksek olduğu gözlenmiştir. B-HA/PEO/Ti ve M-HA/PEO/Ti gruplarında bakteriyel hücre yapışması belirli oranlarda azalmış ancak O-HA içeren grup kadar etkin olmamıştır. Yapılan yüzey karakterizasyon çalışmaları, M-HA ve B-HA partiküllerinin malzeme yüzeyinde kümelenerek daha pürüzlü bir topografi oluşturduğunu göstermiş ve HA partikül morfolojileri sebebiyle antibakteriyel etkinin azaldığı sonucuna varılmıştır.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar doğrultusunda, HA ile işlevselleştirilmiş PEO'in, hem bakteri yapışmasını azaltabilecek, hem de osseointegrasyonu destekleyebilecek alternatif bir implant kaplama malzemesi olduğu düşünülmüştür. Normal şartlarda hücre yapışmasını desteklemeyen PEO kaplamaların osteojenik etkisinin HA katkısıyla büyük oranda artırılacağı kanıtlanmıştır. Üretilen PEO fiber antibakteriyel etkisinin, O-HA katkısıyla değişmediği, B-HA ve M-HA katkısıyla azalmasına rağmen bakteri yapışmasını belirli oranlarda engellediği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlarla başarılı kaplamalar elde edilmiştir ve eksik

olan özelliklerin tamamlanmasıyla biyomedikal uygulamalarda kullanılacak alternatif bir kaplama malzemesi üretimine olanak sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Park, J., Lakes, R. S., *Biomaterials: an introduction*, Springer Science & Business Media, **2007**.
- [2] Geetha, M., Singh, A., Asokamani, R., Gogia, A., Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review, *Progress in Materials Science*, 54, 397-425, **2009**.
- [3] Neoh, K. G., Hu, X., Zheng, D., Kang, E. T., Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces, *Biomaterials*, 33, 2813-2822, **2012**.
- [4] Roosjen, A., de Vries, J., van der Mei, H. C., Norde, W., Busscher, H. J., Stability and effectiveness against bacterial adhesion of poly (ethylene oxide) coatings in biological fluids, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 73, 347-354, **2005**.
- [5] Harris, L., Tosatti, S., Wieland, M., Textor, M., Richards, R., Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly (L-lysine)-grafted-poly (ethylene glycol) copolymers, *Biomaterials*, 25, 4135-4148, **2004**.
- [6] Raynor, J. E., Petrie, T. A., García, A. J., Collard, D. M., Controlling Cell Adhesion to Titanium: Functionalization of Poly [oligo (ethylene glycol) methacrylate] Brushes with Cell-Adhesive Peptides, *Advanced Materials*, 19, 1724-1728, **2007**.
- [7] Nayak, A. K., Hydroxyapatite synthesis methodologies: an overview, *International Journal of ChemTech Research*, 2, 903-907, **2010**.
- [8] Bernstein, A., Nöbel, D., Mayr, H. O., Berger, G., Gildenhaar, R., Brandt, J., Histological and histomorphometric investigations on bone integration of rapidly resorbable calcium phosphate ceramics, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84, 452-462, **2008**.
- [9] Tunçay, Ö. E., *Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
- [10] Gümüşderelioğlu, M., Tunçay, E. Ö., Kaynak, G., Demirtaş, T. T., Aydın, S. T., Hakkı, S. S., Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120-128, **2015**.
- [11] Pasinli, A., Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler, *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4, 25-34, **2004**.
- [12] Gümüşderelioğlu, M., Tıbbın geleceği biyomalzemeler, *Bilim Teknik*, 3, 50-62, **2002**.

- [13] Mavrogenis, A., Dimitriou, R., Parvizi, J., Babis, G., Biology of implant osseointegration, *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 9, 61-71, **2009**.
- [14] Balamurugan, A., Rajeswari, S., Balossier, G., Rebelo, A. H. S., Ferreira, J. M. F., Corrosion aspects of metallic implants—an overview, *Materials and Corrosion*, 59, 855-869, **2008**.
- [15] Niinomi, M., Nakai, M., Titanium-based biomaterials for preventing stress shielding between implant devices and bone, *International Journal of Biomaterials*, 2011, **2011**.
- [16] Bruschi, M., Steinmüller-Nethl, D., Goriwoda, W., Rasse, M., Composition and Modifications of Dental Implant Surfaces, *Journal of Oral Implants*, 2015, **2015**.
- [17] Damodaran, V. B., Bhatnagar, D., Leszczak, V., Popat, K. C., Titania nanostructures: a biomedical perspective, *RSC Advances*, 5, 37149-37171, **2015**.
- [18] Yenyol, S., *Saf titanyum implant yüzeylerinin değişik yöntemlerle modifikasyonu, ve karakterizasyonu-in vitro çalışma*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul **2006**.
- [19] Liu, X., Chu, P. K., Ding, C., Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 47, 49-121, **2004**.
- [20] Feng, B., Chen, J., Qi, S., He, L., Zhao, J., Zhang, X., Characterization of surface oxide films on titanium and bioactivity, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13, 457-464, **2002**.
- [21] Hacıvatçioğlu, H., İmplant malzemelerinin yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi, *Türkiye Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Dergisi*, 10, 178-183, **2011**.
- [22] Gittens, R. A., Olivares-Navarrete, R., Cheng, A., Anderson, D. M., McLachlan, T., Stephan, I., Geis-Gerstorf, J., Sandhage, K. H., Fedorov, A. G., Rupp, F., The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells, *Acta Biomaterialia*, 9, 6268-6277, **2013**.
- [23] Wilkinson, A., Hewitt, R. N., McNamara, L. E., McCloy, D., Meek, R. D., Dalby, M. J., Biomimetic microtopography to enhance osteogenesis in vitro, *Acta Biomaterialia*, 7, 2919-2925, **2011**.
- [24] Zinger, O., Anselme, K., Denzer, A., Habersetzer, P., Wieland, M., Jeanfils, J., Hardouin, P., Landolt, D., Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography, *Biomaterials*, 25, 2695-2711, **2004**.
- [25] Le Guehennec, L., Lopez-Heredia, M.-A., Enkel, B., Weiss, P., Amouriq, Y., Layrolle, P., Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces, *Acta Biomaterialia*, 4, 535-543, **2008**.

- [26] Gittens, R. A., McLachlan, T., Olivares-Navarrete, R., Cai, Y., Berner, S., Tannenbaum, R., Schwartz, Z., Sandhage, K. H., Boyan, B. D., The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation, *Biomaterials*, 32, 3395-3403, **2011**.
- [27] Elias, C. N., Oshida, Y., Lima, J. H. C., Muller, C. A., Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1, 234-242, **2008**.
- [28] Kılınc. Y. , E. E., Dental implant yüzey teknolojisinde yeni yaklaşımlar, *Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 3, 9-18, **2011**.
- [29] Mendonça, G., Mendonça, D. B., Aragao, F. J., Cooper, L. F., Advancing dental implant surface technology—from micron-to nanotopography, *Biomaterials*, 29, 3822-3835, **2008**.
- [30] Eriksson, C., Broberg, M., Nygren, H., Öster, L., Novel in vivo method for evaluation of healing around implants in bone, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66, 662-668, **2003**.
- [31] Eriksson, C., Nygren, H., Ohlson, K., Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone, *Biomaterials*, 25, 4759-4766, **2004**.
- [32] Kennedy, S. B., Washburn, N. R., Simon, C. G., Amis, E. J., Combinatorial screen of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation, *Biomaterials*, 27, 3817-3824, **2006**.
- [33] Zhao, G., Raines, A., Wieland, M., Schwartz, Z., Boyan, B., Requirement for both micron-and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography, *Biomaterials*, 28, 2821-2829, **2007**.
- [34] Manivasagam, G., Dhinasekaran, D., Rajamanickam, A., Biomedical implants: Corrosion and its prevention-a review, *Recent Patents on Corrosion Science*, 2, 40-54, **2010**.
- [35] Evans, N. T., Torstrick, F. B., Lee, C. S., Dupont, K. M., Safranski, D. L., Chang, W. A., Macedo, A. E., Lin, A. S., Boothby, J. M., Whittingslow, D. C., High-strength, surface-porous polyether-ether-ketone for load-bearing orthopedic implants, *Acta Biomaterialia*, 13, 159-167, **2015**.
- [36] Goodman, S. B., Yao, Z., Keeney, M., Yang, F., The future of biologic coatings for orthopaedic implants, *Biomaterials*, 34, 3174-3183, **2013**.
- [37] Jäger, M., Böge, C., Janissen, R., Rohrbeck, D., Hülsen, T., Lensing-Höhn, S., Krauspe, R., Herten, M., Osteoblastic potency of bone marrow cells cultivated on functionalized biometals with cyclic RGD-peptide, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101, 2905-2914, **2013**.

- [38] Aro, H. T., Alm, J. J., Moritz, N., Mäkinen, T. J., Lankinen, P., Low BMD affects initial stability and delays stem osseointegration in cementless total hip arthroplasty in women: a 2-year RSA study of 39 patients., *Acta Orthopaedica*, 83, 107-114, **2012**.
- [39] Darouiche, R. O., Treatment of infections associated with surgical implants, *New England Journal of Medicine*, 350, 1422-1429, **2004**.
- [40] Zhao, L., Chu, P. K., Zhang, Y., Wu, Z., Antibacterial coatings on titanium implants, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 91, 470-480, **2009**.
- [41] Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C. R., The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance, *Biomaterials*, 27, 2331-2339, **2006**.
- [42] Dunne, W. M., Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 155-166, **2002**.
- [43] Lindsay, D., Von Holy, A., Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know, *Journal of Hospital Infection*, 64, 313-325, **2006**.
- [44] Hetrick, E. M., Schoenfisch, M. H., Reducing implant-related infections: active release strategies, *Chemical Society Reviews*, 35, 780-789, **2006**.
- [45] Tuson, H. H., Weibel, D. B., Bacteria–surface interactions, *Soft Matter*, 9, 4368-4380, **2013**.
- [46] Donlan, R. M., Costerton, J. W., Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 167-193, **2002**.
- [47] Garrett, T. R., Bhakoo, M., Zhang, Z., Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, *Progress in Natural Science*, 18, 1049-1056, **2008**.
- [48] Yu, Q., Wu, Z., Chen, H., Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications, *Acta Biomaterialia*, 16, 1-13, **2015**.
- [49] Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., Amouriq, Y., Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, *Dental Materials*, 23, 844-854, **2007**.
- [50] Aparicio, C., Gil, F. J., Fonseca, C., Barbosa, M., Planell, J. A., Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications., *Biomaterials*, 24, 263-273, **2003**.
- [51] Piattelli, M., Scarano, A., Paolantonio, M., Iezzi, G., Petrone, G., Piattelli, A., Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits, *Journal of Oral Implantology*, 28, 2-8, **2002**.

- [52] Franchi, M., Bacchelli, B., Martini, D., De Pasquale, V., Orsini, E., Ottani, V., Fini, M., Giavaresi, G., Giardino, R., Ruggeri, A., Early detachment of titanium particles from various different surfaces of endosseous dental implants, *Biomaterials*, 25, 2239-2246, **2004**.
- [53] Massaro, C., Rotolo, P., De Riccardis, F., Milella, E., Napoli, A., Wieland, M., Textor, M., Spencer, N., Brunette, D., Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13, 535-548, **2002**.
- [54] Oh, S.-H., Finones, R. R., Daraio, C., Chen, L.-H., Jin, S., Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes, *Biomaterials*, 26, 4938-4943, **2005**.
- [55] Wang, X. X., Hayakawa, S., Tsuru, K., Osaka, A., A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research*, 54, 172-178, **2001**.
- [56] Turkan, U., Guden, M., The effect of surface treatment on CaP deposition of Ti6Al4V open cell foams in SBF solution, *Ceramics International*, 36, 1805-1816, **2010**.
- [57] Sul, Y. T., The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant, *Biomaterials*, 24, 3893-3907, **2003**.
- [58] Tamai, K., Kawate, K., Kawahara, I., Takakura, Y., Sakaki, K., Inorganic antimicrobial coating for titanium alloy and its effect on bacteria, *Journal of Orthopaedic Science*, 14, 204-209, **2009**.
- [59] Antoci, V., Adams, C. S., Parvizi, J., Davidson, H. M., Composto, R. J., Freeman, T. A., Wickstrom, E., Ducheyne, P., Jungkind, D., Shapiro, I. M., The inhibition of Staphylococcus epidermidis biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection., *Biomaterials*, 29, 4684-4690, **2008**.
- [60] Jose, B., Antoci, V., Zeiger, A. R., Wickstrom, E., Hickok, N. J., Vancomycin covalently bonded to titanium beads kills Staphylococcus aureus, *Chemistry & Biology*, 12, 1041-1048, **2005**.
- [61] Stigter, M., Bezemer, J., De Groot, K., Layrolle, P., Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy, *Journal of Controlled Release*, 99, 127-137, **2004**.
- [62] Lucke, M., Schmidmaier, G., Sadoni, S., Wildemann, B., Schiller, R., Haas, N., Raschke, M., Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats, *Bone*, 32, 521-531, **2003**.
- [63] Popat, K. C., Eltgroth, M., LaTempa, T. J., Grimes, C. A., Desai, T. A., Decreased Staphylococcus epidermidis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes, *Biomaterials*, 28, 4880-4888, **2007**.

- [64] Gosheger, G., Harges, J., Ahrens, H., Streitburger, A., Buerger, H., Erren, M., Gonsel, A., Kemper, F. H., Winkelmann, W., von Eiff, C., Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model—an analysis of the infection rate and toxicological side effects, *Biomaterials*, 25, 5547-5556, **2004**.
- [65] Bai, X., More, K., Rouleau, C. M., Rabiei, A., Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components., *Acta Biomaterialia*, 6, 2264-2273, **2010**.
- [66] Gallardo-Moreno, A. M., Pacha-Olivenza, M. A., Saldaña, L., Pérez-Giraldo, C., Bruque, J. M., Vilaboa, N., González-Martín, M. L., In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation, *Acta Biomaterialia*, 5, 181-192, **2009**.
- [67] Kaper, H. J., Busscher, H. J., Norde, W., Characterization of poly (ethylene oxide) brushes on glass surfaces and adhesion of Staphylococcus epidermidis, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 14, 313-324, **2003**.
- [68] Kingshott, P., Wei, J., Bagge-Ravn, D., Gadegaard, N., Gram, L., Covalent attachment of poly (ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion, *Langmuir*, 19, 6912-6921, **2003**.
- [69] Chua, P.-H., Neoh, K.-G., Kang, E.-T., Wang, W., Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, *Biomaterials*, 29, 1412-1421, **2008**.
- [70] Duymuş, Z. Y., Güngör, H., Dental İmplant Materyalleri, *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2013, **2013**.
- [71] Bosco, R., Edreira, E. R. U., Wolke, J. G., Leeuwenburgh, S. C., van den Beucken, J. J., Jansen, J. A., Instructive coatings for biological guidance of bone implants, *Surface and Coatings Technology*, 233, 91-98, **2013**.
- [72] Evis, Z., Çeşitli İyonlar Eklenmiş Nano-Hidroksiapatitler: Üretim Yöntemleri, İç Yapı, Mekanik ve Biyouyumluluk Özellikleri Yönlerinden İncelenmesi, *Int. J. Eng. Res. Dev.*, 3, 55-61, **2011**.
- [73] Becker, J., Kirsch, A., Schwarz, F., Chatzinikolaidou, M., Rothamel, D., Lekovic, V., Jennissen, H. P., Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs, *Clinical Oral Investigations*, 10, 217-224, **2006**.
- [74] De Jonge, L. T., Leeuwenburgh, S. C., Wolke, J. G., Jansen, J. A., Organic–inorganic surface modifications for titanium implant surfaces, *Pharmaceutical Research*, 25, 2357-2369, **2008**.
- [75] Rammelt, S., Illert, T., Bierbaum, S., Scharnweber, D., Zwipp, H., Schneiders, W., Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate, *Biomaterials*, 27, 5561-5571, **2006**.

- [76] Morra, M., Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins, *Eur Cell Mater*, 12, **2006**.
- [77] Schliephake, H., Scharnweber, D., Dard, M., Sewing, A., Aref, A., Roessler, S., Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 73, 88-96, **2005**.
- [78] Bailey, F. J., Koleske, J., *Poly (ethylene oxide)*, Academic Press Inc., New York, **1976**.
- [79] Şimşek, M., *Nanofiber-desenli polimerik membranlar: Yüzey kimyası, topografisi ve hücreyel etkileşimler*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara, **2014**.
- [80] Brodbeck, W. G., Patel, J., Voskerician, G., Christenson, E., Shive, M. S., Nakayama, Y., Matsuda, T., Ziats, N. P., Anderson, J. M., Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 10287-10292, **2002**.
- [81] Vendra, V. K., Wu, L., Krishnan, S., Polymer thin films for biomedical applications, *Nanotechnologies for the Life Sciences*, **2007**.
- [82] Roosjen, A., Kaper, H. J., van der Mei, H. C., Norde, W., Busscher, H. J., Inhibition of adhesion of yeasts and bacteria by poly (ethylene oxide)-brushes on glass in a parallel plate flow chamber, *Microbiology*, 149, 3239-3246, **2003**.
- [83] Currie, E., Norde, W., Stuart, M. C., Tethered polymer chains: surface chemistry and their impact on colloidal and surface properties, *Advances in Colloid and Interface Science*, 100, 205-265, **2003**.
- [84] Holmes, P., Currie, E., Thies, J., Van der Mei, H., Busscher, H., Norde, W., Surface-modified nanoparticles as a new, versatile, and mechanically robust nonadhesive coating: Suppression of protein adsorption and bacterial adhesion, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91, 824-833, **2009**.
- [85] George, P. A., Donose, B. C., Cooper-White, J. J., Self-assembling polystyrene-block-poly (ethylene oxide) copolymer surface coatings: Resistance to protein and cell adhesion, *Biomaterials*, 30, 2449-2456, **2009**.
- [86] Razatos, A., Ong, Y.-L., Boulay, F., Elbert, D. L., Hubbell, J. A., Sharma, M. M., Georgiou, G., Force measurements between bacteria and poly (ethylene glycol)-coated surfaces, *Langmuir*, 16, 9155-9158, **2000**.
- [87] Maddikeri, R., Tosatti, S., Schuler, M., Chessari, S., Textor, M., Richards, R., Harris, L., Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84, 425-435, **2008**.
- [88] Harbers, G. M., Emoto, K., Greef, C., Metzger, S. W., Woodward, H. N., Mascali, J. J., Grainger, D. W., Lochhead, M. J., Functionalized poly (ethylene glycol)-based bioassay surface chemistry that facilitates bio-immobilization and

inhibits nonspecific protein, bacterial, and mammalian cell adhesion, *Chemistry of Materials*, 19, 4405-4414, **2007**.

[89] Schuler, M., Owen, G. R., Hamilton, D. W., de Wild, M., Textor, M., Brunette, D. M., Tosatti, S. G., Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study, *Biomaterials*, 27, 4003-4015, **2006**.

[90] Germanier, Y., Tosatti, S., Broggin, N., Textor, M., Buser, D., Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces, *Clinical Oral Implants Research*, 17, 251-257, **2006**.

[91] Uysal, U., *Nano ve mikron boyutta hidroksiapatit üretimine proses parametrelerinin etkisinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2012**.

[92] Saiz, E., Gremillard, L., Menendez, G., Miranda, P., Gryn, K., Tomsia, A. P., Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds, *Materials Science and Engineering: C*, 27, 546-550, **2007**.

[93] Oosterbos, C., Rahmy, A., Tonino, A., Witpeerd, W., High survival rate of hydroxyapatite-coated hip prostheses 100 consecutive hips followed for 10 years, *Acta Orthopaedica*, 75, 127-133, **2004**.

[94] Pasinli, A., Aksoy, R. S., Yapay Kemik Uygulamaları İçin Hidroksiapatit, *Electronic Journal of BioTechnology*, 1, 41-51, **2010**.

[95] Ong, J. L., Chan, D. C., Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review, *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 28, **2000**.

[96] Knabe, C., Klar, F., Fitzner, R., Radlanski, R., Gross, U., In vitro investigation of titanium and hydroxyapatite dental implant surfaces using a rat bone marrow stromal cell culture system, *Biomaterials*, 23, 3235-3245, **2002**.

[97] Aday, S., Gümüşderelioğlu, M., Bone-like apatite-coated chitosan scaffolds: Characterization and osteoblastic activity., *Polymer Composites*, 31, 1418-1426, **2010**.

[98] Maviş, B., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G., Çolak, Ü., Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 5, 3098-3111, **2009**.

[99] Kaynak, G., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioğlu, M., Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10xSBF-like solution by microwave irradiation, *Materials Science and Engineering: C*, **2015**.

[100] Jalota, S., Bhaduri, S. B., Tas, A. C., Osteoblast proliferation on neat and apatite-like calcium phosphate-coated titanium foam scaffolds, *Materials Science and Engineering: C*, 27, 432-440, **2007**.

- [101] Pasinli, A., Yıldız, H., Çelik, E., Aksoy, R., Mechanical properties of calcium-phosphate coatings on Ti6Al4V implant materials by biomimetic method, *Electronic Journal of Machine Technologies*, 4, 1-10, **2008**.
- [102] Yılmaz, B., Zafer, E., Güldiken, M., Titanyum Alaşımının Biyomimetik Yöntemle Kalsiyum Fosfat Kaplanması, *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 29, **2014**.
- [103] Vallet-Regi, M., González-Calbet, J. M., Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in Solid State Chemistry*, 32, 1-31, **2004**.
- [104] Kalita, S. J., Bhatt, H. A., Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization, *Materials Science and Engineering: C*, 27, 837-848, **2007**.
- [105] Yang, F., Dong, W. J., He, F. M., Wang, X. X., Zhao, S. F., Yang, G. L., Osteoblast response to porous titanium surfaces coated with zinc-substituted hydroxyapatite, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 113, 313-318, **2012**.
- [106] Webster, T. J., Massa-Schlueter, E. A., Smith, J. L., Slamovich, E. B., Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations, *Biomaterials*, 25, 2111-2121, **2004**.
- [107] Shepherd, J. H., Shepherd, D. V., Best, S. M., Substituted hydroxyapatites for bone repair, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 2335-2347, **2012**.
- [108] Fielding, G. A., Roy, M., Bandyopadhyay, A., Bose, S., Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings, *Acta Biomaterialia*, 8, 3144-3152, **2012**.
- [109] Xia, W., Lindahl, C., Lausmaa, J., Borchardt, P., Ballo, A., Thomsen, P., Engqvist, H., Biomaterialized strontium-substituted apatite/titanium dioxide coating on titanium surfaces, *Acta Biomaterialia*, 6, 1591-1600, **2010**.
- [110] Capuccini, C., Torricelli, P., Sima, F., Boanini, E., Ristoscu, C., Bracci, B., Socol, G., Fini, M., Mihailescu, I., Bigi, A., Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response, *Acta Biomaterialia*, 4, 1885-1893, **2008**.
- [111] Ni, G., Lu, W., Chiu, K., Li, Z., Fong, D., Luk, K., Strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement for primary hip replacement: An in vivo study, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 77, 409-415, **2006**.
- [112] Cooper, L. F., Zhou, Y., Takebe, J., Guo, J., Abron, A., Holmén, A., Ellingsen, J. E., Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted cp titanium endosseous implants, *Biomaterials*, 27, 926-936, **2006**.

- [113] Berglundh, T., Abrahamsson, I., Albouy, J. P., Lindhe, J., Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs, *Clinical Oral Implants Research*, 18, 147-152, **2007**.
- [114] Devirian, T. A., Volpe, S. L., The physiological effects of dietary boron, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 219-231, **2003**.
- [115] Hakki, S. S., Bozkurt, B. S., Hakki, E. E., Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 243-250, **2010**.
- [116] Ternane, R., Cohen-Adad, M. T., Panczer, G., Goutaudier, C., Kbir-Arigoib, N., Trabelsi-Ayedi, M., Florian, P., Massiot, D., Introduction of boron in hydroxyapatite: synthesis and structural characterization, *Journal of Alloys and Compounds*, 333, 62-71, **2002**.
- [117] Barheine, S., Hayakawa, S., Jäger, C., Shirotsaki, Y., Osaka, A., Effect of Disordered Structure of Boron-Containing Calcium Phosphates on their In Vitro Biodegradability, *Journal of the American Ceramic Society*, 94, 2656-2662, **2011**.
- [118] Hayakawa, S., Sakai, A., Tsuru, K., Osaka, A., Fujii, E., Kawabata, K., Jaeger, C., Preparation and characterization of boron-containing hydroxyapatite, *Key Engineering Materials*, 361, 191-194, **2008**.
- [120] Shikhaliyeva, İ., *Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasının bor katkılı HAp-kaplı kitosan doku iskelelerinde incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.
- [121] Mishnaevsky, L., Levashov, E., Valiev, R. Z., Segurado, J., Sabirov, I., Enikееv, N., Prokoshkin, S., Solov'yov, A. V., Korotitskiy, A., Gutmanas, E., Nanostructured titanium-based materials for medical implants: Modeling and development, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 81, 1-19, **2014**.
- [122] Ravichandran, R., Ng, C., C., H., Liao, S., Pliszka, D., Raghunath, M., Ramakrishna, S., Chan, C., K., Biomimetic surface modification of titanium surfaces for early cell capture by advanced electrospinning, *Biomedical Materials*, 7, 015001, **2012**.
- [123] Huang, H. H., Ho, C. T., Lee, T. H., Lee, T. L., Liao, K. K., Chen, F. L., Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion, *Biomolecular Engineering*, 21, 93-97, **2004**.
- [124] Jayaraman, M., Meyer, U., Bühner, M., Joos, U., Wiesmann, H.-P., Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro, *Biomaterials*, 25, 625-631, **2004**.
- [125] Truong, V. K., Lapovok, R., Estrin, Y. S., Rundell, S., Wang, J. Y., Fluke, C. J., Crawford, R. J., Ivanova, E. P., The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium, *Biomaterials*, 31, 3674-3683, **2010**.

- [126] Abdal-hay, A., Hamdy, A. S., Khalil, K. A., Lim, J. H., A novel simple one-step air jet spinning approach for deposition of poly (vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants, *Materials Science and Engineering: C*, 49, 681-690, **2015**.
- [127] Pattanayak, D. K., Kawai, T., Matsushita, T., Takadama, H., Nakamura, T., Kokubo, T., Effect of HCl concentrations on apatite-forming ability of NaOH–HCl- and heat-treated titanium metal, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 2401-2411, **2009**.
- [128] Pattanayak, D. K., Yamaguchi, S., Matsushita, T., Kokubo, T., Effect of heat treatments on apatite-forming ability of NaOH-and HCl-treated titanium metal, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22, 273-278, **2011**.
- [129] Lü, W., Wang, N., Gao, P., Li, C., Zhao, H., Zhang, Z., Effects of anodic titanium dioxide nanotubes of different diameters on macrophage secretion and expression of cytokines and chemokines, *Cell Proliferation*, 48, 95-104, **2015**.
- [130] Kokubo, T., Takadama, H., How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*, 27, 2907-2915, **2006**.
- [131] Sunal, E., *Periodontal rejenerasyon için Kitosan/nano-Hidroksiapatit/PCL bariyer membranların geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği, Ankara, **2015**.
- [132] Habibovic, P., Barrere, F., Blitterswijk, C. A., Groot, K., Layrolle, P., Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants, *Journal of the American Ceramic Society*, 85, 517-522, **2002**.
- [133] Tas, A. C., Bhaduri, S. B., Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10× simulated body fluid, *Journal of Materials Research*, 19, 2742-2749, **2004**.
- [134] Beşkardeş, I. G., Gümüşderelioğlu, M., Biomimetic apatite-coated PCL scaffolds: effect of surface nanotopography on cellular functions, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24, 507-524, **2009**.
- [135] Königsberger, E., Königsberger, L., *Biomineralization: medical aspects of solubility*, Wiley Online Library, **2006**.
- [136] Komlev, V., Fadeeva, I., Gurin, A., Kovaleva, E., Smirnov, V., Gurin, N., Barinov, S., Effect of the concentration of carbonate groups in a carbonate hydroxyapatite ceramic on its in vivo behavior, *Inorganic Materials*, 45, 329-334, **2009**.
- [138] Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., Farson, D., Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Materials Science and Engineering: C*, 27, 504-509, **2007**.
- [139] Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S., Park, W. H., The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly (ethylene oxide) fibers, *Polymer*, 45, 2959-2966, **2004**.

- [140] Zhou, C., Wang, Q., Wu, Q., UV-initiated crosslinking of electrospun poly (ethylene oxide) nanofibers with pentaerythritol triacrylate: Effect of irradiation time and incorporated cellulose nanocrystals, *Carbohydrate Polymers*, 87, 1779-1786, **2012**.
- [141] Tosatti, S., Schwartz, Z., Campbell, C., Cochran, D. L., VandeVondele, S., Hubbell, J. A., Denzer, A., Simpson, J., Wieland, M., Lohmann, C. H., RGD-containing peptide GCRGYGRGDSPG reduces enhancement of osteoblast differentiation by poly (L-lysine)-graft-poly (ethylene glycol)-coated titanium surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 68, 458-472, **2004**.
- [142] Ito, T., Sasaki, M., Taguchi, T., Enhanced ALP activity of MG63 cells cultured on hydroxyapatite-poly (ethylene glycol) hydrogel composites prepared using EDTA-OH, *Biomedical Materials*, 10, 015025, **2015**.
- [143] Declercq, H. A., Verbeeck, R. M. H., De Ridder, L. I. F. J. M., Schacht, E. H., Cornelissen, M. J., Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures, *Biomaterials*, 26, 4964-4974, **2005**.
- [144] Stein, G. S., Lian, J. B., Owen, T. A., Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation, *The FASEB journal*, 4, 3111-3123, **1990**.
- [145] Golub, E. E., Boesze-Battaglia, K., The role of alkaline phosphatase in mineralization, *Current Opinion in Orthopaedics*, 18, 444-448, **2007**.
- [146] Olsen, B. R., Reginato, A. M., Wang, W., Bone development, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 191-220, **2000**.
- [147] Park, K. D., Lee, B. A., Piao, X. H., Lee, K. K., Park, S. W., Oh, H. K., Kim, Y. J., Park, H. J., Effect of magnesium and calcium phosphate coatings on osteoblastic responses to the titanium surface, *The Journal of Advanced Prosthodontics*, 5, 402-408, **2013**.
- [148] Young, M. F., Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis, *Osteoporosis International*, 14, 35-42, **2003**.
- [149] Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., Kou, D., Shen, Y., Cheng, X., Rompis, F. A., Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells, *Biological Trace Element Research*, 144, 306-315, **2011**.
- [150] Komori, T., Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2, *Cell and Tissue Research*, 339, 189-195, **2010**.
- [151] Wu, C., Miron, R., Sculean, A., Kaskel, S., Doert, T., Schulze, R., Zhang, Y., Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds, *Biomaterials*, 32, 7068-7078, **2011**.

- [152] Park, J. B., The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and osteopontin expression, *Journal of Surgical Research*, 173, 99-104, **2012**.
- [153] Schierholz, J., Beuth, J., Implant infections: a haven for opportunistic bacteria, *Journal of Hospital Infection*, 49, 87-93, **2001**.
- [154] Ribeiro, M. R. d. C., *Study of nanostructured hydroxyapatite based surfaces to prevent biofilm formation associated to implant infections*, Yüksek Lisans Tezi, Porto Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Portekiz, **2012**.
- [155] Siswomihardjo, W., Sunarintyas, S., Tontowi, A. E., The effect of zirconia in hydroxyapatite on *Staphylococcus epidermidis* growth, *International Journal of Biomaterials*, 2012, **2012**.
- [156] Khoo, X., O'Toole, G. A., Nair, S. A., Snyder, B. D., Kenan, D. J., Grinstaff, M. W., *Staphylococcus aureus* resistance on titanium coated with multivalent PEGylated-peptides, *Biomaterials*, 31, 9285-9292, **2010**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Derya KALELİOĞLU
Doğum Yeri : Çankaya
Medeni Hali : Bekar
E-posta : derya.kaleli@gmail.com
Adresi : 3222. Cad 3227.Sok 1-G blok No: 14 Güneş Sitesi Yaşamkent
ÇANKAYA/ANKARA

Eğitim

Lise : 75. Yıl Lisesi
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü
Doktora : -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İleri)

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

Biyomalzemeler, İmplant malzemeleri, Doku mühendisliği

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-